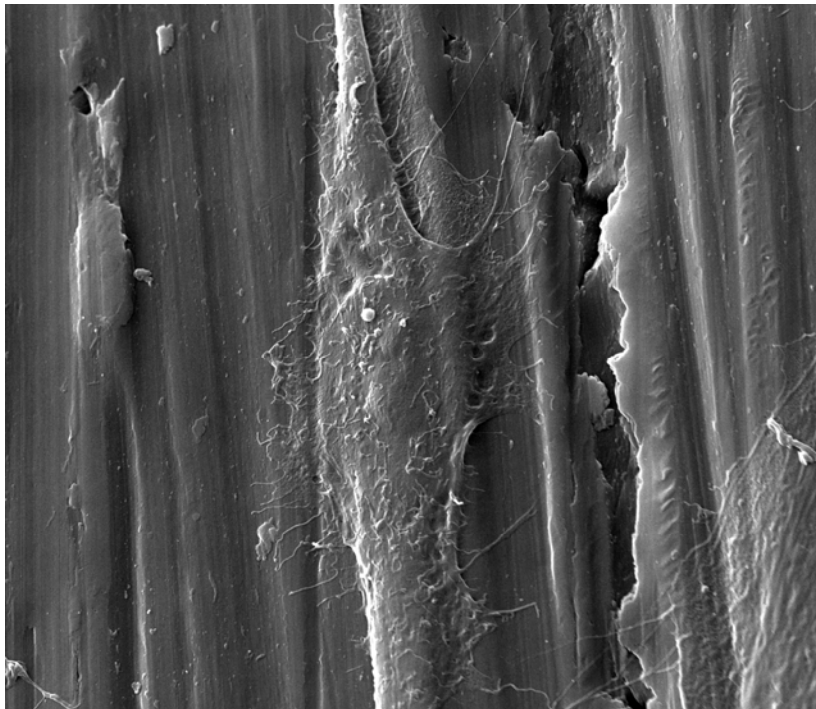




UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA



***Respuesta celular a modificaciones superficiales de
aleaciones metálicas convencionales empleadas en
cirugía ortopédica***

Alicia Calzado Martín

Madrid, 2012



Departamento de Bioquímica

Facultad de Medicina

Universidad Autónoma de Madrid

***Respuesta celular a modificaciones superficiales de
aleaciones metálicas convencionales empleadas en
cirugía ortopédica***

Memoria presentada por Alicia Calzado Martín, Licenciada en Biología,
para optar al grado de Doctor

Directoras

Dra. Nuria E. Vilaboa Díaz

Dra. Laura Saldaña Quero

Tutora

Dra. Carmela Calés Bourdet

Hospital Universitario la Paz, IdiPAZ

Madrid, 2012

NURIA E. VILABOA DÍAZ, Doctora en Farmacia, Investigadora del Hospital Universitario La Paz de Madrid.

LAURA SALDAÑA QUERO, Doctora en Ciencias Químicas, Investigadora del Hospital Universitario La Paz de Madrid.

CERTIFICAN:

Que **Alicia Calzado Martín**, Licenciada en Ciencias Biológicas, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado: “Respuesta celular a modificaciones superficiales de aleaciones metálicas convencionales empleadas en cirugía ortopédica”, que presenta como Tesis Doctoral.

Madrid, 30 de Marzo de 2012

Nuria E. Vilaboa Díaz

Laura Saldaña Quero

La Dra. **CARMELA CALÉS BOURDET**, profesora titular del departamento de Bioquímica de la Universidad Autónoma de Madrid, tutora de **Alicia Calzado Martín** en el programa de doctorado en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina, ratifica el presente certificado.

Madrid, 30 de Marzo de 2012

Carmela Calés Bourdet

Este trabajo se ha llevado a cabo mediante financiación concedida por los siguientes organismos: Fundación de Investigación Médica Mutua Madrileña, Ministerio de Ciencia e Innovación (MAT2006-12948-C04-02, MAT2009-14695-C04-02 y CIT-420000-2008-17), CIBER de Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN) y Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Universitario La Paz.

A mis padres

“El cuerpo tiene poderes que la mente desconoce”

Philip K. Dick (Valis, 1981)

AGRADECIMIENTOS

El desarrollo de esta Tesis no hubiese sido posible sin la participación de un gran número de personas e instituciones que han facilitado su ejecución. Por ello, es para mí un placer utilizar este espacio para reflejar mi gratitud.

Quisiera expresar un profundo agradecimiento a la Dra. Nuria Vilaboa y a la Dra. Laura Saldaña por creer en mí, aceptarme bajo su dirección y ayudarme a llevar a cabo este proyecto.

Quiero agradecer a la Dra. Nuria Vilaboa todas las horas de dedicación, su esfuerzo y su ayuda incesante. Su generoso aporte constante de ideas ha contribuido de un modo inestimable tanto al desarrollo de mi trabajo como a mi formación como investigadora. Gracias por trabajar intensamente para sacar la Tesis adelante, a pesar de las dificultades.

A la Dra. Laura Saldaña por su apoyo y confianza constantes, por haberme transmitido todos sus conocimientos pacientemente, y por haber dedicado tantas horas a mi formación. Su capacidad de trabajo y organización han sido mi referente durante todos los años que llevo a su lado. Gracias por tus pacientes correcciones y tu implicación en el desarrollo de esta Tesis.

Me gustaría incluir un recuerdo muy especial para el Prof. Luis Munuera, con el cual compartí algunos momentos durante mis primeros años en el laboratorio. En todas sus visitas intentó ilustrarme con su sabiduría, de la cual espero retener al menos una pequeña parte.

Al Dr. José Luís González-Carrasco y a la Dra. María Luisa González-Martín por su apoyo y colaboración incesantes a lo largo de estos años. Quiero agradecerles su predisposición constante para ayudarme y por aclarar todas mis dudas pacientemente.

A todas las personas que han colaborado en el desarrollo y caracterización de los materiales ensayados, Marta Multigner, Antonio Méndez-Vilas, Hannu Korhonen, Antti Soininen, Teemu J. Kinnari, Veli-Mati Tiainen, Reijo Lappalainen e Yrjo Konttinen.

Al Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología del Hospital Universitario la Paz por facilitarnos las muestras de hueso utilizadas en el trabajo.

A la Dra. Julia Buján por introducirme en el fascinante mundo de los biomateriales y sugerirme la posibilidad de dedicarme a la investigación.

A los doctores Enrique Gómez Barrena, Teresa Bellón, Luis Álvarez y Carmela Calés, porque todos ellos de un modo u otro han contribuido notablemente a mi formación.

A nuestro colaborador en la sombra, Alfonso, por prestarme su ayuda siempre que lo he necesitado.

A mis compañeros de laboratorio, por su apoyo constante y amistad. Sé que sin vosotros no hubiese podido llevar a cabo este proyecto. A Gema, gracias por transmitirme generosamente tus conocimientos, por orientarme y ayudarme constantemente. A Pachi y Arancha, por escucharme siempre y por sus sabios consejos, tanto científicos como

personales. A Virginia y Fátima quiero agradecerles la ayuda prestada en la poyata y su amistad fuera de ella. Gracias por estar ahí. A Lara, por todos los momentos compartidos que han amenizado los últimos años. Finalmente a Alba, por su ayuda en el laboratorio.

A mis compañeros de la Unidad de Investigación, gracias a todos por vuestro apoyo. Habéis conseguido que mi estancia en el centro merezca la pena.

Además de la gente directamente relacionada con mi trabajo, quisiera expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas, amigos y compañeros que con su apoyo, consejos y amistad, me han ayudado a lograr el objetivo. A mis profesores, Carlos y Yolanda, que me han enseñado a luchar para lograr mis objetivos y han contribuido a mi desarrollo personal. A Rogelio, Concha, María y Lucía, gracias por vuestro apoyo y cariño. A mis amigos Jorge, Almu, Itsaso, Carol, Karina, Félix, Juan, Eduardo, Bea, Laro, Dulce, Adri y otros tantos que han estado ahí, que hacen que esto tenga sentido. Quiero destacar la ayuda de Jorge, que ha escuchado todas mis presentaciones pacientemente e incluso se ha atrevido a preguntar. A mi familia y a mi abuela. A mis padres, por apoyarme en todas las decisiones que he tomado a lo largo de mi vida, por estar siempre a mi lado, por su ayuda incondicional y sus buenos consejos. A ellos quiero dedicarles esta tesis.

A Pablo, muchas gracias por todos los momentos, tanto los buenos como los malos que siempre son mejores contigo.

Por último, quisiera agradecer el apoyo económico de la Fundación de Investigación Médica Mutua Madrileña, Ministerio de Ciencia e Innovación (MAT2006-12948-C04-02, MAT2009-14695-C04-02 y CIT-420000-2008-17), CIBER de Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN) y Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Universitario La Paz.

RESUMEN

El empleo de modificaciones superficiales en la composición química o en la topografía de un implante permiten mejorar sus propiedades mecánicas, físicas y biológicas, en función de la aplicación clínica para la que han sido diseñados. La combinación de películas de carbono tipo diamante (DLC) con polidimetilsiloxano (DLC-PDMS-h) o politetrafluoretileno (DLC-PTFE-h) mediante deposición por arco pulsado conduce a la generación de recubrimientos híbridos homogéneos que poseen la dureza y la resistencia a la corrosión del DLC y las propiedades antiadherentes de los polímeros. En este trabajo, hemos evaluado el efecto del DLC-PDMS-h y DLC-PTFE-h sobre la funcionalidad de células osteoformadoras y precursoras mesenquimales humanas. Los recubrimientos híbridos de DLC presentan una hidrofobicidad muy similar en términos de ángulo de contacto, si bien sus ángulos de deslizamiento son distintos. Los recubrimientos DLC-PTFE-h, con elevado ángulo de deslizamiento, permiten la correcta adhesión y proliferación de ambos tipos celulares. Por el contrario, las películas de DLC-PDMS-h, con ángulos de deslizamiento cercano a cero dificultan estas funciones celulares. Las escasas células adheridas a estas superficies presentan características de células apoptóticas, con una morfología contraída, un citoesqueleto muy desorganizado, pérdida de la integridad de su membrana y expresión de la forma activa de caspasa-3. Estos resultados indican que los recubrimientos híbridos de DLC permiten controlar la adhesión de células osteoformadoras y precursoras a través de modificaciones en las propiedades físicas de su superficie.

Las aleaciones de Ti64 se emplean en la fabricación de implantes ortopédicos debido a sus excelentes propiedades mecánicas, buena resistencia a la corrosión y biocompatibilidad. La modificación de la aleación Ti64 mediante abrasión mecánica conduce a la formación de topografías ordenadas con rugosidades promedio en los rangos nanométrico y submicrométrico. En este trabajo, hemos estudiado la respuesta de células osteoformadoras y precursoras mesenquimales humanas a estas superficies anisotrópicas. Las topografías ordenadas promueven la adhesión y proliferación de células precursoras a la aleación Ti64 así como su maduración hacia linaje osteogénico. Ambos tipos celulares se orientan y elongan sobre las superficies mecanizadas, organizando su citoesqueleto de actina y matriz de fibronectina en la dirección de los surcos. El fenómeno de orientación por contacto sobre superficies submicrométricas implica formación de filopodios y la orientación temprana de fibras de estrés, microtúbulos y contactos focales en la dirección de los surcos. La GTPasa RhoA participa en el proceso de orientación de células precursoras sobre superficies submicrométricas a través de su efector ROCK, pero no en el de células osteoformadoras. Estos resultados indican que las superficies mecanizadas de Ti64 permiten controlar la orientación celular y la diferenciación de células mesenquimales a través de irregularidades periódicas que alteran su topografía.

SUMMARY

Surface modification of biomaterials, either by changing their chemical composition or by providing topographical cues, are commonly used to improve their performance, by enhancing their mechanical and physical properties or their biological behavior, depending on the clinical application for which they have been designed. The combination of diamond-like carbon films (DLC) with polydimethylsiloxane (DLC-PDMS-h) or polytetrafluoroethylene (DLC-PTFE-h), by a filtered pulsed arc discharge technique, produces homogeneous hybrid coatings that couple the hardness and resistance to wear and corrosion of DLC with the non-sticky properties of polymers. In this study, the effect of DLC-PDMS-h and DLC-PTFE-h coatings on the behavior of human mesenchymal stem cells and primary osteoblasts was investigated. Both hybrid coatings show similar hydrophobicity in terms of contact angle, but their sliding angle values are quite different. Our findings show that cells efficiently attach and grow on DLC-PTFE-h surfaces, with high sliding angle value. In contrast, DLC-PDMS-h films, with sliding angle values close to zero, greatly impair all cellular functions examined. The few cells attached to these surfaces exhibit apoptotic features, such as contracted morphology, disorganized cytoskeleton, loss of membrane integrity and expression of active caspase-3. These results indicate that DLC hybrid coatings control the adhesion of both cell types through their different physical properties.

Ti64 alloy is frequently used in the manufacture of orthopedic devices owing to its excellent mechanical properties, good corrosion resistance and biocompatibility. Surface modification of Ti64 alloy by mechanical abrasion leads to the formation of nano- and submicron-grooved surfaces. In this study, the responses of human mesenchymal stem cells and primary osteoblasts to anisotropic roughening of the alloy have been evaluated. Our findings show that patterned topographies enhance the adhesion, proliferation and osteoblastic differentiation of human precursor cells. Both cell types orient and elongate on patterned surfaces through the alignment of actin cytoskeleton and fibronectin matrix in the direction of the grooves. Contact guidance on submicrometric surfaces involves the formation of filopodia and early orientation of stress fibers, microtubules and focal contacts along the grinding direction. The GTPase RhoA is involved in the process of contact guidance of human precursor cells on submicrometric surfaces via its effector ROCK, but not in primary osteoblasts. These results indicate that patterned Ti64 surfaces control orientation of both cell types and differentiation of human precursor cells through periodic irregularities in their topography.

ÍNDICE

ÍNDICE	1
ABREVIATURAS	5
INTRODUCCIÓN	8
1. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL HUESO	9
1.1. Matriz ósea.....	10
1.2. Células óseas	11
2. BIOMATERIALES EMPLEADOS EN CIRUGÍA ORTOPÉDICA	13
2.1. Aleaciones metálicas empleadas en cirugía ortopédica	15
2.1.1. Aceros inoxidables	15
2.1.2. Aleaciones de base Co	16
2.1.3. Aleaciones de base Ti.....	16
2.2. Modificaciones superficiales de aleaciones metálicas.....	17
2.2.1. Modificaciones en la composición química superficial.....	17
2.2.2. Modificaciones en la topografía	19
3. RESPUESTA BIOLÓGICA A UN IMPLANTE ORTOPÉDICO.....	20
3.1. Proceso de adhesión al sustrato: citoesqueleto y morfología celular	21
3.1. Alineación por contacto. GTPasas Rho	23
OBJETIVOS	27
MATERIALES Y MÉTODOS	29
1. FABRICACIÓN DE LAS MUESTRAS.....	30
2. CARACTERIZACIÓN DE LOS MATERIALES	31
3. CULTIVOS CELULARES.....	32
3.1. Caracterización fenotípica de células mesenquimales humanas.....	33
3.2. Caracterización fenotípica de cultivos primarios de células de linaje osteoblástico ..	35
4. ENSAYOS DE ADHESIÓN Y PROLIFERACIÓN CELULAR	35
5. ENSAYOS DE DIFERENCIACIÓN CELULAR	36
5.1. Diferenciación a linaje osteoblástico	36
5.2. Diferenciación a linaje adipogénico	36
6. CUANTIFICACIÓN Y ENSAYOS DE ATENUACIÓN DE LAS ACTIVIDADES DE LA GTPASA RHOA Y DE SU EFECTOR ROCK.....	37
7. MORFOLOGÍA CELULAR Y REORGANIZACIÓN DEL CITOESQUELETO DE ACTINA.....	38
8. ENSAYOS DE INMUNOFLOURESCENCIA	39
9. ANÁLISIS DE LOS CONTACTOS FOCALES.....	39

10. ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR.....	40
11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	40
RESULTADOS	41
1. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LAS CÉLULAS.....	42
2. EFECTO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA SUPERFICIAL DE RECUBRIMIENTOS BASADOS EN CARBONO TIPO DIAMANTE SOBRE LA RESPUESTA CELULAR	44
2.1. Caracterización de los recubrimientos de DLC y DLC-h	44
2.2. Efecto de la composición química de los recubrimientos en el proceso de adhesión celular.....	45
2.2.1. Efecto de la composición química de los recubrimientos sobre la morfología celular	45
2.2.2. Efecto de la composición química de los recubrimientos sobre la reorganización del citoesqueleto de actina.....	46
2.2.3. Efecto de la composición química de los recubrimientos sobre la reorganización del citoesqueleto de tubulina	47
2.2.4. Efecto de la composición química de los recubrimientos sobre el área celular.....	48
2.3. Efecto de la composición química de los recubrimientos sobre la vitalidad celular ...	49
2.3.1. Efecto de la composición química de los recubrimientos sobre la viabilidad celular	49
2.3.2. Efecto de la composición química de los recubrimientos sobre la expresión de la forma activa de la caspasa-3.....	50
2.3.3 Efecto de la composición química de los recubrimientos sobre la proliferación celular	51
3. EFECTO DE LA TOPOGRAFÍA ORDENADA DE LA ALEACIÓN Ti64 SOBRE LA RESPUESTA CELULAR	53
3.1. Caracterización de las superficies modificadas de la aleación Ti64 mediante abrasión mecánica	53
3.2. Efecto de la topografía ordenada de la aleación Ti64 en los procesos de orientación por contacto.....	55
3.2.1. Efecto de la topografía ordenada de la aleación Ti64 sobre la cinética de adhesión celular.....	55
3.2.2. Efecto de la topografía ordenada de la aleación Ti64 sobre la morfología, reorganización del citoesqueleto de actina y orientación celular.....	56

3.2.3. Efecto de la topografía ordenada de la aleación Ti64 en la organización de la fibronectina.....	59
3.3. Estudio de los mecanismos implicados en el proceso de orientación celular sobre topografías ordenadas de la aleación Ti64	60
3.3.1. Formación de prolongaciones celulares durante el proceso de orientación celular sobre topografías ordenadas de la aleación Ti64	61
3.3.2. Formación de contactos focales durante el proceso de orientación celular sobre topografías ordenadas de la aleación Ti64	63
3.4. Participación de la vía RhoA/ROCK en los procesos de alineación y elongación celular sobre topografías ordenadas de la aleación Ti64	65
3.4.1. Actividad de RhoA y ROCK.	65
3.4.2. Efecto de la atenuación de la actividad de RhoA y ROCK en el proceso de orientación y elongación celular sobre topografías ordenadas de la aleación Ti64. ..	68
3.4.3. Efecto de la atenuación de la actividad de RhoA y ROCK en la organización del citoesqueleto de α -acetil-tubulina en células cultivadas sobre topografías ordenadas de la aleación Ti64.	73
3.5. Efecto de la topografía ordenada de la aleación Ti64 sobre los procesos de proliferación y diferenciación celular.....	74
3.5.1. Efecto de la topografía ordenada de la aleación Ti64 sobre la proliferación celular.	75
3.5.2. Efecto de la topografía ordenada de la aleación Ti64 sobre la diferenciación de células hMSCs ..	75
DISCUSIÓN	78
1. EFECTO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA SUPERFICIAL DE RECUBRIMIENTOS BASADOS EN CARBONO TIPO DIAMANTE SOBRE LA RESPUESTA CELULAR	79
2. EFECTO DE LA TOPOGRAFÍA ORDENADA DE LA ALEACIÓN Ti64 SOBRE LA RESPUESTA CELULAR	83
CONCLUSIONES	91
BIBLIOGRAFÍA	93
APÉNDICE	104

ABREVIATURAS

AFM: Microscopia de fuerza atómica
BMPs: Proteínas morfogenéticas óseas
BSP: Sialoproteína ósea
Cbfa1/Runx2: "Core binding factor alpha 1"
C3: Transferasa C3 permeable a membrana
C/EBPs: Proteína de unión al "enhancer" CCAAT beta
Col I: Colágeno tipo I
CoCrMo: Cobalto-Cromo-Molibdeno
CoNiCrMo: Cobalto-Níquel-Cromo-Molibdeno
CRF2-4: Receptor de citoquinas clase II
DLC: Carbono tipo diamante
EDX: Análisis por dispersión de rayos X
ERK: Quinasas reguladas por señales extracelulares
ERM: Proteínas de la familia ezrina, radixina y moesina
FA: Fosfatasa alcalina
FAK: Quinasa de adhesión focal
FBS: Suero fetal bovino
FFT: Rutina de transformada rápida de Fourier
FN: Fibronectina
FPAD: Sistema de deposición por arco pulsado
GAPs: Proteínas activadoras de GTPasas
GTPasa: Guanosina trifosfatasa
GEFs: Factores de intercambio de nucleótidos de guanina
GDIs: Inhibidores de la disociación de nucleótidos de guanina
HF: Hidroxifasudil
IGF: Factores análogos a insulina
Ihh: Homólogo indian hedgehog
IP: Yoduro de propidio
JNK: Quinasas c-Jun N-terminal
LIMK: Lim quinasa
MEB: Microscopia electrónica de barrido
MEC: Matriz extracelular
MLCK: Quinasa de cadena ligera de miosina
MSC: Células precursoras mesenquimales
OB: Osteoblastos

OC: Osteocalcina

OPN: Osteopontina

Osx: Osterix

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PPAR γ : Receptor activado por proliferadores de peroxisomas γ

PBS: Solución salina tamponada de fosfato

PDMS: Polidimetilsiloxano

PE: Poliestireno

PFA: Paraformaldehido

PTFE: Politetrafluoretileno o teflón®

PTH: Hormona paratiroidea

RGD: Tripéptido Arg-Gly-Asp

ROCK: Quinasa asociada a Rho

Shh: Homólogo sonic hedgehog

TGF- α : Factor de crecimiento transformante α

TGF- β : Factor de crecimiento transformante β

Ti64: 90% de Titanio, 6% de Aluminio, 4% de Vanadio

TNF: Factor de necrosis tumoral

INTRODUCCIÓN

1. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL HUESO

El hueso es una forma especializada de tejido conectivo mineralizado que desempeña funciones esenciales para el organismo, entre las que destaca su papel fundamental como soporte estructural del cuerpo. Asimismo el esqueleto protege órganos internos y sostiene tejidos blandos, permite el movimiento y es un reservorio iónico para la homeostasis mineral. Teniendo en cuenta su importancia funcional, se puede inferir que lesiones de este tejido implican un alto impacto en la calidad de vida del individuo.

El tejido óseo es un tejido muy vascularizado y presenta una estructura altamente organizada en laminillas óseas. En función de su disposición estructural se distinguen dos tipos de hueso, el cortical o compacto y el esponjoso o trabecular (Fig. 1 A). El hueso cortical se localiza en la parte externa de los huesos formando una capa compacta y densa. Está constituido por unidades estructurales denominadas osteonas, compuestas por laminillas concéntricas de matriz ósea alrededor de un conducto central, el conducto de Havers (Fig. 1 B) [Cooper y col. 1966]. El tejido esponjoso está formado por trabéculas óseas dispuestas en distintas direcciones, formando una red irregular en la que se alberga la médula ósea. La orientación de las trabéculas y la disposición de las laminillas óseas están determinadas por fuerzas locales, confiriendo al hueso propiedades mecánicas únicas que le permiten resistir esfuerzos y transferir cargas sin romperse [revisado en el libro “Principles of Bone Biology”].

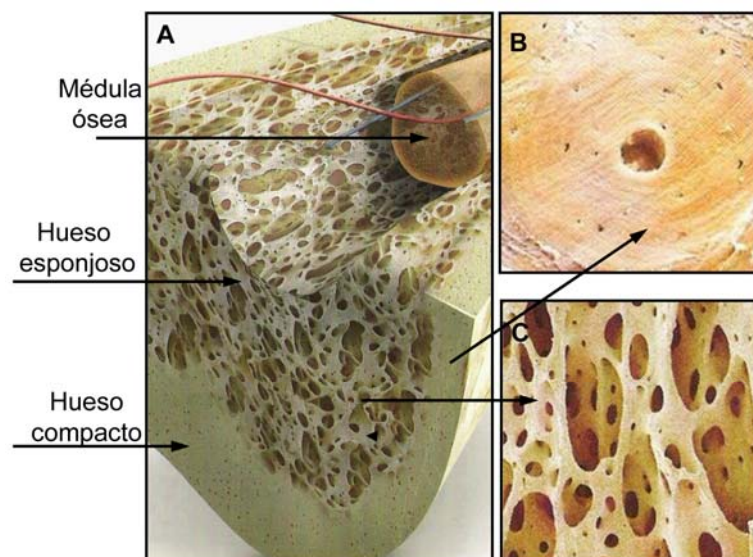


Figura 1. Representación esquemática del hueso. (A) Sección de un hueso largo que muestra la organización y localización de los distintos tipos de tejido óseo. **(B)** Detalle de una osteona, unidad estructural del hueso compacto. **(C)** Disposición de las trabéculas en el hueso esponjoso.

Tanto el hueso compacto como el esponjoso están compuestos por células especializadas y matriz ósea. La formación de hueso se produce en el organismo durante el desarrollo embrionario, el crecimiento y la reparación de fracturas. Además, a lo largo de la

vida del individuo, este tejido sufre un proceso constante de formación y resorción que condiciona el mantenimiento del volumen óseo, la reparación del daño tisular y la homeostasis del metabolismo mineral [revisado en Martin y Seeman 2008].

1.1. Matriz ósea

La matriz ósea consta de dos componentes principales, una matriz orgánica constituida por proteínas y una fase mineral formada por sales inorgánicas. El componente mineral del hueso representa aproximadamente dos tercios de la masa ósea y está formado en su mayor parte por un tipo de fosfato cálcico, cuya estructura es muy similar al mineral hidroxiapatita. Además contiene magnesio, sodio, potasio, manganeso y flúor en bajas proporciones. La matriz orgánica representa aproximadamente un tercio de la masa ósea y está compuesta por colágeno y proteínas no colágenas. Aproximadamente el 90% de la matriz orgánica está constituida por colágeno tipo I aunque existe un pequeño porcentaje de colágeno tipo V [Anselme 2000]. La proteína no colágena más abundante y exclusiva del hueso es la osteocalcina (OC), que se une específicamente a los cristales de hidroxiapatita de la fase mineral [Ducy y col. 1996]. La matriz orgánica contiene otras proteínas tales como osteonectina, osteopontina (OPN), sialoproteína ósea (BSP), fibronectina (FN), trombospondina y vitronectina. La mayoría de estas proteínas, así como el colágeno tipo I, presentan propiedades adhesivas debido a que contienen en su secuencia el tripéptido Arg-Gly-Asp (RGD), que es reconocido por los receptores de la superficie celular [Anselme 2000]. Además, entre los componentes no colágenos de la matriz orgánica se encuentran algunos proteoglicanos, tales como ácido hialurónico, condroitín sulfato, queratán sulfato, biglicano y decorina. Todas las proteínas que constituyen la matriz orgánica son sintetizadas por células osteoformadoras, los osteoblastos, y la mayoría están involucradas en procesos de adhesión celular y mineralización de la matriz [Anselme 2000, Young y col. 2003].

La matriz ósea es responsable de las extraordinarias propiedades mecánicas del hueso. Las fibras colágenas le proporcionan flexibilidad y resistencia a la tensión mientras que las sales minerales le confieren dureza, rigidez y resistencia a la compresión. Asimismo es un reservorio de calcio y fósforo para el organismo, y sus proteínas participan activamente en el mantenimiento de la integridad y funcionalidad del tejido óseo [Young y col. 2003].

1.2. Células óseas

En el hueso se distinguen dos tipos de células, los osteoblastos y los osteoclastos, responsables de la formación y resorción ósea, respectivamente.

Los osteoclastos son células grandes, multinucleadas que derivan de precursores hematopoyéticos del linaje monocítico. Estas células contribuyen al mantenimiento de la integridad del esqueleto y regulan la homeostasis de electrolitos en el organismo [Väänänen y col. 2000].

Los osteoblastos (OB) son células mononucleadas, de morfología fusiforme, con citoplasma basófilo, aparato de Golgi y retículo endoplasmático rugoso de gran tamaño. Su función principal es la formación de hueso mediante la síntesis, secreción, organización y mineralización de la matriz ósea [Watkins y col. 2001]. Además, modulan la resorción ósea llevada a cabo por los osteoclastos a través de la síntesis de citoquinas específicas y factores de crecimiento [Simonet y cols. 1997]. Los OB proceden de la diferenciación de células precursoras de origen mesenquimal (MSC) que se localizan en la médula ósea, un tejido complejo, sinusoidal y bien organizado que se encuentra en la cavidad medular de los huesos largos, el esternón, la pelvis y las vértebras esponjosas. Las células MSC de la médula ósea fueron identificadas por primera vez por Friedenstein y col. (1974) y se describieron como células adherentes, de morfología fibroblastoide, capaces de diferenciarse hacia células de origen mesodérmico tales como osteoblastos, condrocitos o adipocitos. Estas células expresan en su membrana antígenos de superficie como CD105, CD73, CD90, CD44, CD29, CD13, CD106, CD166 y carecen de marcadores específicos de linaje hematopoyético como CD34 y CD45 o del sistema inmune como CD14 [Pittenger y col. 1999]. Además de su elevada plasticidad para madurar hacia diversos linajes, las células MSC poseen capacidad de auto-renovación a lo largo de la vida del individuo. Entre los mecanismos moleculares de señalización que regulan la auto-renovación, proliferación y diferenciación de las células MSC destacan las rutas mediadas por Wnt, Notch y Hedgehog, y los factores de transcripción Nanog, Oct3/4 y Sox-2 [Takahashi y Yamanaka 2006, Campbell y col. 2008, Huangfu y col. 2008].

El proceso de osteogénesis comienza con el reclutamiento de células osteoprogenitoras en sitios activos de reconstrucción ósea y está regulado por señales paracrinas, autocrinas y endocrinas. Entre los factores de crecimiento que controlan los procesos de migración y proliferación celular destacan el TGF- β (factor transformante de crecimiento β), el PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas) e IGF-I y II (factores análogos a insulina I y II) [Devescovi y col. 2008]. Por otro lado, las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), miembros de la superfamilia del TGF- β , junto con los factores de transcripción

Osx (Osterix) y Runx2 (también conocido como Cbfa1, del inglés “core binding factor alpha 1”) constituyen los reguladores más potentes del proceso de diferenciación de células MSC hacia el linaje osteoblástico [revisado en Komori 2006]. Las BMPs inducen la expresión de Runx2 y Osx en células MSC y la acción coordinada de Runx2 y BMPs regula la expresión de genes específicos de fenotipo osteoblástico [Ducy y col 1997, Long 2011]. El proceso de diferenciación osteoblástica requiere también la participación de hormonas, entre las que destacan la PTH (hormona paratiroidea), glucocorticoides y 1,25-dihidroxitamina D₃ así como la presencia de estímulos mecánicos [Watkins y col. 2001].

Durante la adquisición del fenotipo osteoblástico, las células atraviesan distintos estados funcionales que se caracterizan por la síntesis de componentes orgánicos de la matriz extracelular, secreción de proteínas implicadas en la maduración del osteoide y síntesis de proteínas que contribuyen a la mineralización ósea. La transición entre estas fases se caracteriza por la expresión secuencial de genes implicados en el crecimiento y maduración osteoblástica (Fig. 2). El colágeno tipo I, la fosfatasa alcalina (FA) y la FN se expresan de forma temprana en células MSC comprometidas hacia el linaje osteoblástico. La expresión de OPN es característica de preosteoblastos mientras que la BSP y la OC adquieren sus máximos niveles de expresión durante la diferenciación del pre-osteoblasto al osteoblasto, y son características del periodo de mineralización [Aubin y col. 1996; Stein y col. 1996]. Estas proteínas se han identificado como marcadores de formación ósea y su cuantificación es muy útil en el estudio *in vitro* del proceso de maduración de MSC hacia el linaje osteoformador.

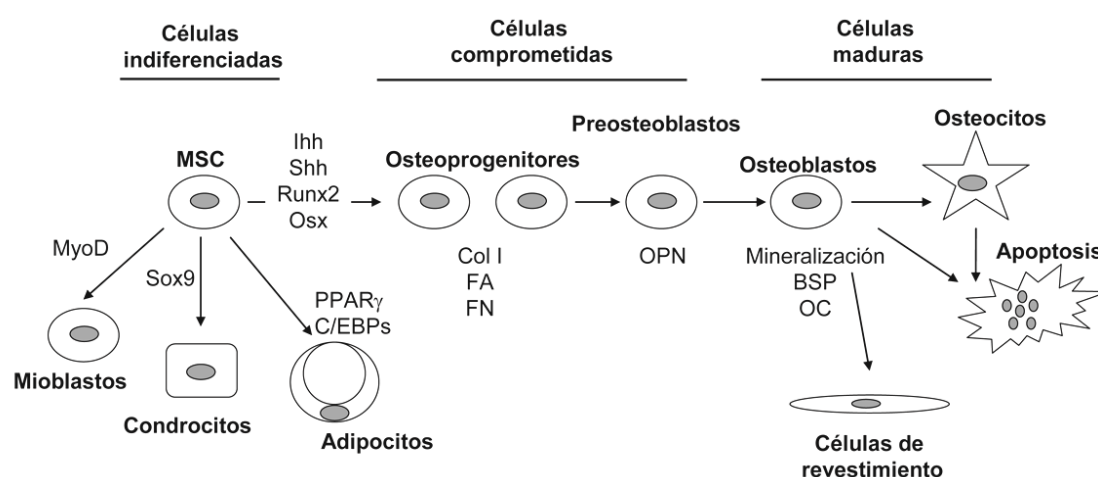


Figura 2. Representación esquemática de la diferenciación de células MSC hacia diversos linajes. Detalle de los principales marcadores de diferenciación osteoblástica. MSC: células precursoras mesenquimales, PPAR γ : receptor activado por proliferadores de peroxisomas, C/EBPs: proteína de unión al *enhancer* CCAAT beta, Ihh: homólogo indian hedgehog, Shh: homólogo sonic hedgehog, Osx: osterix, Col I: colágeno I, FA: fosfatasa alcalina, FN: fibronectina, OPN: osteopontina, BSP: sialoproteína ósea, OC: osteocalcina.

La vida media de los osteoblastos humanos es de 1 a 10 semanas, al término de las cuales pueden sufrir apoptosis, transformarse en osteocitos o en células de revestimiento superficial [revisado en “Principles of Bone Biology”]. Los osteocitos son osteoblastos maduros que se encuentran embebidos en el hueso mineralizado. Poseen morfología estrellada con prolongaciones citoplasmáticas que les permiten comunicarse entre sí, son sensibles a estímulos mecánicos y están implicados en la detección de microfracturas óseas [Bonewald y Johnson 2008]. Las células de revestimiento superficial son osteoblastos con morfología aplanada que recubren la superficie ósea del interior de los huesos. Estas células procesan los residuos originados por los osteoclastos tras la resorción ósea e inician la formación de hueso, mediante la deposición de una fina capa de colágeno [Everts y col. 2002].

Como se ha mencionando anteriormente, las células MSC tienen capacidad para diferenciarse hacia otros linajes, incluyendo el linaje adipocítico, que implica la activación de un programa de expresión génica mediado por factores de transcripción entre los cuales destacan PPAR γ (receptores activados por proliferadores de peroxisomas) y C/EBPs (proteína de unión al “enhancer” CCAAT beta) [revisado en Lefterova y Lazar 2009]. Durante su maduración a adipocitos, las células adquieren una morfología redondeada caracterizada por la presencia de vesículas lipídicas almacenadas en su interior. El proceso de diferenciación adipogénica va acompañado de cambios en la actividad de las enzimas implicadas en el metabolismo de los triglicéridos tales como la ATP citrato liasa, enzima málica, acetilCo-A carboxilasa y la estearoil-CoA desaturasa. Las células diferenciadas poseen un número mayor de transportadores de glucosa y de receptores de insulina, por lo que aumenta su sensibilidad a estas moléculas [Gregoire y col. 1998].

2. BIOMATERIALES EMPLEADOS EN CIRUGÍA ORTOPÉDICA

El envejecimiento progresivo de la población ha conducido a un importante aumento en la incidencia de patologías osteoarticulares de tipo degenerativo. Asimismo se ha producido un incremento en el número de personas jóvenes con trastornos en el aparato locomotor, como consecuencia de los accidentes de circulación o la práctica de deportes de alto riesgo. En muchas ocasiones, el tratamiento médico conservador no logra resolver estas patologías por lo que es necesario el reemplazo del tejido no funcional por elementos artificiales conocidos como implantes ortopédicos o prótesis. La cirugía de sustitución articular no es una intervención definitiva y en muchos casos es necesaria una segunda intervención. De hecho, aproximadamente un 10% de las prótesis implantadas requieren una revisión en los 10 primeros años tras su implantación. Entre las causas que conducen al fallo del implante

destacan su incorrecta interacción con el tejido circundante y la liberación de productos de degradación a consecuencia del desgaste, corrosión o fatiga. El desgaste del implante se produce como consecuencia de un deslizamiento entre dos superficies en contacto y conduce al desprendimiento de partículas del material. La corrosión es el proceso de degradación sufrido por un biomaterial debido a la presencia de un medio fisiológico agresivo y conduce principalmente a la liberación de iones. La resistencia a la fatiga se define como la resistencia para soportar cargas cíclicas. La fatiga puede dar lugar a la fractura del material y por tanto a la aparición de partículas de desgaste. Ante esta perspectiva, la investigación en el desarrollo de biomateriales funcionales y poco agresivos para el organismo ha experimentado un extraordinario avance en los últimos años.

Los biomateriales se definen como materiales destinados a interaccionar con los sistemas biológicos en la evaluación o tratamiento de una enfermedad [Williams y col. 1992]. Los materiales empleados en biomedicina deben ser biocompatibles y biofuncionales, lo que limita las materias primas con las que se puede abordar su diseño. La biocompatibilidad se define como la capacidad del material para ser aceptado por el medio biológico que lo rodea o tolerado por el organismo. Asimismo, el material debe poseer buenas características biofuncionales que le capaciten para aportar las prestaciones necesarias que requiera la aplicación a la que vaya a ser destinado.

Dentro de los tratamientos quirúrgicos empleados en cirugía ortopédica y traumatología, la sustitución protésica de las articulaciones ha sido uno de los mayores avances logrados en el último siglo. La cirugía de sustitución articular permite la reconstrucción de una articulación deteriorada mediante el empleo de una articulación artificial o prótesis, devolviéndole movilidad y restaurando su función. Las articulaciones sustituidas con más frecuencia son la cadera y la rodilla. Dependiendo del tipo de anclaje al hueso que se emplee, las prótesis pueden ser cementadas, si se fijan empleando un cemento quirúrgico, o no cementadas, cuando el implante se ancla directamente al hueso. En la figura 3 se detallan los componentes de una prótesis total de cadera entre los que se encuentran un vástago metálico, una cabeza esférica metálica o cerámica, y un componente acetabular metálico o cerámico con una superficie articulante generalmente de polietileno. Los materiales usados en las superficies articulares deben presentar una buena resistencia al desgaste mientras que los empleados tanto en componentes femorales como acetabulares de prótesis sin cementar deben asegurar una correcta fijación ósea y transmisión de cargas entre el hueso y el implante.

Mientras que la cirugía de sustitución articular precisa la implantación de materiales de forma permanente en el organismo, existen numerosas intervenciones que requieren el uso de biomateriales de forma temporal, tales como placas de osteosíntesis, clavos o tornillos (Fig. 3).

En la mayoría de los casos los dispositivos temporales se emplean como elementos de fijación u osteosíntesis en la consolidación de fracturas mediante la estabilización temporal de los fragmentos óseos. Estos dispositivos deben mantener la continuidad y la alineación de las partes del hueso fracturadas y han de ser capaces de transmitir las cargas durante la reparación ósea. Por ello, los materiales utilizados para la fabricación de elementos de fijación deben ser biocompatibles y proporcionar elevadas prestaciones mecánicas. Con el fin de facilitar su retirada una vez consolidada la fractura, es conveniente que no exista una excesiva mineralización del tejido circundante.

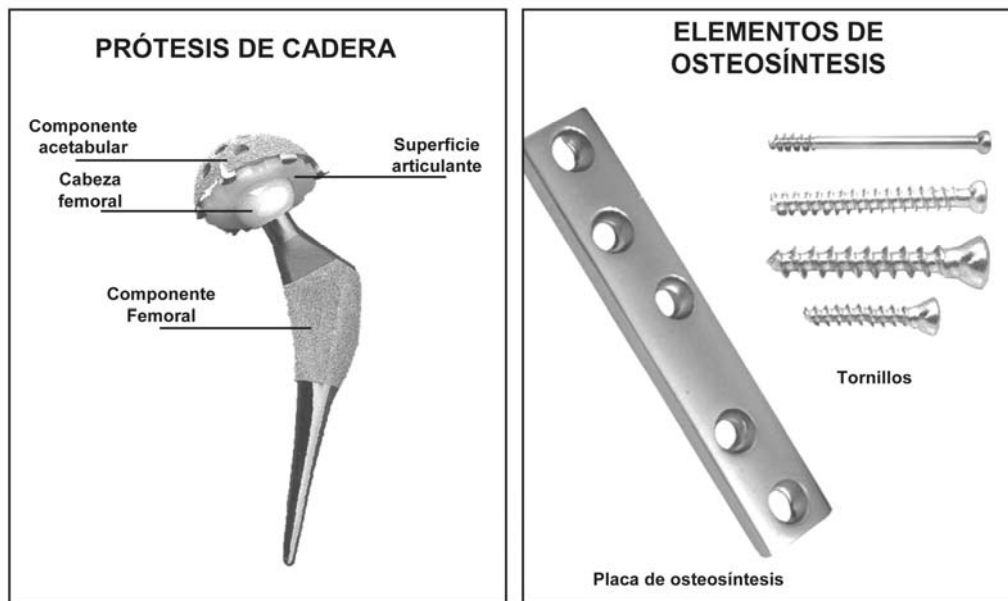


Figura 3. Componentes de una prótesis de cadera y elementos de osteosíntesis.

2.1. Aleaciones metálicas empleadas en cirugía ortopédica

Las aleaciones metálicas poseen una buena resistencia a la corrosión en contacto con los fluidos biológicos, gran ductilidad, y excelentes propiedades mecánicas, muy superiores a las de los metales puros, las cerámicas o los polímeros. Debido a estas características se emplean generalmente en la fabricación de prótesis y dispositivos temporales, y en la actualidad no tienen sustitutos equiparables en aplicaciones que deben soportar carga. Las aleaciones metálicas más utilizadas en cirugía ortopédica son los aceros inoxidables, las aleaciones de base de cobalto (Co) y las aleaciones de titanio (Ti).

2.1.1. Aceros inoxidables

Los aceros inoxidables están compuestos por hierro, carbono y otros elementos aleantes entre los que se incluyen níquel, cromo o molibdeno. Estas aleaciones poseen una

elevada pureza y son más resistentes a la corrosión que los aceros comunes, ya que presentan en su superficie una capa de pasivado rica en óxido de cromo. El acero inoxidable empleado más frecuentemente en la fabricación de implantes es el acero inoxidable AISI 316L forjado. Contiene aproximadamente un 17% de cromo, un 10-14% de níquel y un 2% de molibdeno y presenta una resistencia a la corrosión mayor que otros aceros. En general, los aceros inoxidables presentan una moderada resistencia a la corrosión y poseen un módulo elástico de unos 220 GPa, mucho más elevado que el del tejido óseo (≈ 30 GPa), lo que hace que la transmisión de cargas entre el hueso y el implante no sea eficaz [Wapner 1991, Zysset y col 1999, revisado en Geetha y col. 2009]. Debido a ello, su uso en la fabricación de dispositivos que soportan carga mecánica y requieren una larga vida útil es limitado y su empleo se ha reducido a la fabricación de implantes de uso temporal.

2.1.2. Aleaciones de base Co

Existen dos tipos de aleaciones de base Co, las de Cobalto-Cromo-Molibdeno (CoCrMo) y las de Cobalto-Níquel-Cromo-Molibdeno (CoNiCrMo). Estas aleaciones fueron las primeras utilizadas en la fabricación de acetábulos de prótesis de cadera debido a su gran resistencia al desgaste y su elevada dureza. Asimismo se han empleado como revestimientos porosos para la fijación de prótesis ortopédicas ya que presentan una elevada resistencia mecánica. Al igual que el acero inoxidable, las aleaciones de base Co poseen un elevado módulo elástico (≈ 220 GPa) y sufren corrosión a largo plazo. Además, los iones cromo o cobalto liberados al medio biológico poseen efectos carcinogénicos, por lo que el uso de estas aleaciones es cada vez menos frecuente [Wapner 1991, Okazaki y col. 2005].

2.1.3. Aleaciones de base Ti

Las aleaciones de base Ti presentan un módulo elástico de entre 105 y 120 GPa, menor que el de los aceros inoxidables y las aleaciones de base Co, y poseen baja densidad, por lo que su comportamiento mecánico es más semejante al del hueso [revisado en Geetha y col. 2009]. Además, presentan buena resistencia a la corrosión en el medio biológico debido a la formación espontánea de una capa de óxido en su superficie (TiO_2). La principal desventaja de estos materiales es su baja resistencia al desgaste.

El titanio en estado metálico es un material alotrópico, es decir, puede existir en más de una forma cristalográfica. A temperatura ambiente presenta una estructura hexagonal compacta (fase α). A temperaturas superiores a 882 °C sufre una transformación reversible a

una estructura cúbica (fase β). Esta transformación ofrece la posibilidad de obtener aleaciones con distintas microestructuras α , β o α/β mediante la adición de elementos que estabilizan una u otra fase. Por ejemplo, el aluminio tiende a estabilizar la fase α mientras que el vanadio estabiliza la fase β . La adición de elementos aleantes tales como aluminio y vanadio proporciona a la aleación una mayor resistencia a la fatiga. Actualmente, la aleación Ti64 (Ti6Al4V; 90% de Titanio, 6% de Aluminio, 4% de Vanadio) es la más utilizada en la fabricación de componentes protésicos que van soportar carga y requieren fijación biológica, debido a su elevada resistencia a la fatiga y a la corrosión, así como a su excelente biocompatibilidad [Liu y col. 2004, Jayaraman y col. 2004, Geetha y col. 2009].

2.2. Modificaciones superficiales de aleaciones metálicas

La investigación en biomateriales metálicos se ha dirigido hacia el desarrollo de modificaciones superficiales que permitan mejorar sus propiedades mecánicas, biológicas o su resistencia al desgaste y a la corrosión [revisado en Anselme y col. 2010]. Un aspecto importante a tener en cuenta al modificar la superficie de un material es considerar los requerimientos específicos de la aplicación clínica para la que ha sido diseñado. Por ejemplo, algunos implantes empleados como dispositivos temporales requieren una interacción mínima con el tejido óseo para facilitar su retirada. Sin embargo, los materiales empleados en la zona de unión a hueso de prótesis sin cementar deben interaccionar con el tejido que les rodea promoviendo su osteointegración, es decir, la conexión íntima, directa y funcional entre el hueso y el implante. En este caso, la eficacia a largo plazo del implante dependerá en gran medida de la primera fase de interacción entre las células osteoformadoras y el material, así como de su capacidad de proliferación, diferenciación y mineralización sobre su superficie. Con el fin de mejorar el rendimiento de los implantes, en los últimos años se han investigado modificaciones superficiales que permitan controlar la adhesión de células óseas al material, mediante el desarrollo de técnicas y metodologías encaminadas a modificar las propiedades químicas o topográficas de la superficie de biomateriales convencionales.

2.2.1. Modificaciones en la composición química superficial

El objetivo principal que persiguen las modificaciones en la química superficial de un sustrato metálico es la mejora de sus propiedades físicas, químicas y biológicas. Entre las técnicas empleadas para este fin destacan los tratamientos superficiales y la deposición de recubrimientos. Los tratamientos superficiales como la oxidación térmica, la implantación

iónica o los tratamientos ácidos o alcalinos alteran la composición superficial del material con el fin de mejorar su resistencia al desgaste y a la corrosión así como su biocompatibilidad [Saldaña y col. 2007, Lee y col. 2008, Yao y col. 2010, Yang y col. 2011]. Por ejemplo, la oxidación térmica de la aleación Ti64 resulta en la formación de una capa cerámica en su superficie que disminuye la liberación de iones y mejora la adhesión y la proliferación de células osteoblásticas [Saldaña y col. 2007]. Por otra parte, los tratamientos de anodización sobre esta misma aleación inducen un aumento en la actividad FA de células osteoblásticas [Lee y col. 2008]. Mientras que los tratamientos superficiales conducen a cambios en la composición química del sustrato, la deposición de recubrimientos permite generar composiciones superficiales diferentes a la del material de base sin alterar sus propiedades mecánicas intrínsecas y mejorando su resistencia al desgaste o la corrosión. En la última década, la generación de recubrimientos sobre biomateriales convencionales ha despertado un gran interés debido a la versatilidad de propiedades físicas y químicas que ofrecen. Entre ellos, los materiales basados en carbono tipo diamante (DLC, del inglés “diamond-like carbon”) han ganado mucha atención en los últimos años. Estos recubrimientos súper duros presentan una elevada resistencia al desgaste y la corrosión, buena estabilidad química y bajo coeficiente de fricción. Los recubrimientos de DLC se pueden obtener mediante distintas técnicas incluyendo deposición asistida mediante haz de iones, deposición química en fase vapor asistida por plasma, implantación iónica o pulverización catódica, entre otras [revisado en Roy y Lee 2007]. Según las condiciones utilizadas para su preparación, el recubrimiento puede incluir distintos porcentajes atómicos de hidrógeno que le confieren una densidad y una dureza determinadas. Esto conduce a una amplia gama de propiedades en función de su estructura atómica o la cantidad de hidrógeno incorporada. Además se pueden funcionalizar mediante la adición de otros elementos como Si, P, Ti, N, F o Cu con el fin de adaptar las propiedades superficiales del material a la función biológica específica para la cual han sido diseñados [revisado en Roy y Lee 2007]. La combinación de DLC con polímeros antiadherentes como politetrafluoretileno (PTFE, también conocido como teflón®) o polidimetilsiloxano (PDMS) ha permitido la generación de recubrimientos híbridos de DLC (DLC-h) con distintas propiedades superficiales. Estas películas, producidas mediante deposición por arco pulsado (FPAD), poseen una estructura atómica similar a la de los recubrimientos de DLC puro, con una elevada dureza [Anttilla y col. 2003, Kinnari y col. 2008]. Entre sus propiedades destacan la combinación de la resistencia al desgaste y a la corrosión del DLC con las propiedades antiadherentes del PTFE y PDMS. De cara a su aplicación en cirugía ortopédica no todos los materiales son apropiados para la deposición de este tipo de recubrimientos [Oka y col. 2007]. Para conseguir una buena adhesión de las películas de DLC sobre un sustrato es necesario que

se formen carburos en la superficie del material durante la primera etapa del proceso de deposición [Anttila y col. 1997]. Además, es preferible que los materiales sobre los que se depositan sean relativamente blandos, con valores de dureza Vickers inferiores a 3 GPa para eliminar la tensión residual ejercida por el recubrimiento [Anttila y col. 1997, Alakoski y col. 2003, Tiainen y col. 2008]. En este sentido, diferentes autores han observado que los recubrimientos de DLC se adhieren eficientemente a aleaciones de base Co y aceros inoxidables y podrían emplearse para resolver los problemas asociados a la corrosión que sufren estos materiales en medio biológico [Platon y col. 2001, Roy y col. 2008]. Por otra parte, aunque el Ti forma carburos en su superficie, algunas de sus aleaciones presentan una dureza tan elevada que el espesor de los recubrimientos de DLC depositados no puede ser superior a 1 μm , debido a las tensiones residuales que se generan por las diferencias en la dureza de ambos materiales. Ya que la tensión interna del DLC-PDMS-h y DLC-PTFE-h es inferior a la del DLC, cabría esperar que los recubrimientos híbridos presenten una mejor adhesión a las aleaciones de Ti que el DLC puro. Pese a que estos recubrimientos son candidatos prometedores para su aplicación en la fabricación de implantes ortopédicos, la información acerca de la respuesta de células osteoformadoras a estos sustratos es muy escasa.

2.2.2. Modificaciones en la topografía

Las modificaciones en la topografía de un biomaterial metálico persiguen mejorar su anclaje al tejido óseo, reducir los tiempos de osteointegración y conseguir una mayor transmisión de cargas entre el hueso y el implante. Entre las técnicas más investigadas para incrementar la rugosidad superficial de aleaciones metálicas destacan el arenado con partículas cerámicas micrométricas o los tratamientos de recubrimiento metálico por plasma. Múltiples evidencias en la literatura indican que la generación de rugosidades aleatorias en la superficie de las aleaciones metálicas promueve la adhesión de células osteoblásticas *in vitro*, así como su proliferación y posterior diferenciación [Bachle y col. 2004, Ricci y col. 2008, Saldaña y col. 2006, Schwartz y col. 2009]. Mediante ensayos *in vivo* se ha detectado que las superficies rugosas de biomateriales metálicos presentan mejor anclaje inicial al hueso y mayor porcentaje de contacto óseo que las superficies pulidas [Trisi y col. 1999]. De hecho, es habitual en la práctica clínica el empleo de topografías micrométricas desordenadas en las zonas de carga de implantes no cementados que requieren osteointegración. Sin embargo, se han detectado complicaciones en el recambio de prótesis con superficies rugosas ya que su excesiva osteointegración conlleva la extracción de una elevada cantidad de hueso circundante. Además, hay que tener en cuenta que habitualmente los implantes poseen una

vida media de entre 10 y 30 años, por lo que muchos pacientes jóvenes han de someterse a cirugías de revisión a lo largo de su vida [Kurtz y col. 2009]. Un método prometedor para estimular las interacciones iniciales entre las células óseas con el implante se basa en la generación de superficies que mimeticen las características naturales del hueso, un tejido altamente organizado. La búsqueda de técnicas que permitan controlar el comportamiento celular sobre un material a través de irregularidades periódicas en su superficie ha despertado un gran interés en los últimos años. En este sentido, se han investigado técnicas como la fotolitografía o el láser que permiten generar topografías regulares con dimensiones nano- o micrométricas en aleaciones metálicas convencionales como el Ti64 [Lenhert y col. 2005, Watari y col. 2012]. El inconveniente de estas técnicas radica en que además de modificar la topografía de la aleación generan heterogeneidades químicas en la superficie que pueden interferir en la respuesta celular observada así como en las propiedades del material [Zhao y col. 2008, Lu y col. 2008]. Por otro lado, la modificación del titanio y sus aleaciones mediante abrasión mecánica conduce a la generación de superficies anisotrópicas caracterizadas por la formación de crestas y valles con dimensiones definidas, sin alterar su composición química [Ball y col. 2008]. Datos disponibles en la literatura indican que superficies con topografías ordenadas pueden modular la actividad metabólica, la proliferación y la maduración de distintos tipos celulares tales como células mesenquimales o fibroblastos [revisado en Zhou y col. 2009]. En este sentido, se ha observado un aumento en la actividad metabólica de osteoblastos cultivados sobre sustratos de Ti64 con topografías ordenadas en comparación con superficies con rugosidad aleatoria [Ball y col. 2008]. Sin embargo, no existe información acerca del efecto de estas topografías sobre el comportamiento de precursores mesenquimales. Además, hasta la fecha se desconocen los mecanismos celulares implicados en el reconocimiento de superficies anisotrópicas de Ti64 así como el papel que juegan las dimensiones de la topografía en el comportamiento de células del linaje osteoformador.

3. RESPUESTA BIOLÓGICA A UN IMPLANTE ORTOPÉDICO

La funcionalidad y el rendimiento a largo plazo de un implante dependen en gran medida de las interacciones establecidas entre su superficie y las células del entorno. En muchas ocasiones, la falta de osteointegración conduce a la formación de una cápsula fibrosa alrededor del implante que promueve su desestabilización, inhibe la regeneración y reparación del tejido óseo y aumenta el riesgo de infecciones [revisado en Goodman y col. 2009]. En este contexto se ha observado que las superficies de los materiales que permiten la adhesión

específica de células óseas a su superficie promueven su funcionalidad, resultando finalmente en la formación y deposición de la matriz mineral [Anselme 2000].

3.1. Proceso de adhesión al sustrato: citoesqueleto y morfología celular

Los mecanismos de adhesión celular juegan un papel crucial en la respuesta biológica a un implante. Unos segundos después de la implantación de un dispositivo en el organismo su superficie se recubre de agua y proteínas de matriz extracelular (MEC) [revisado en Anselme y col. 2010]. A continuación las células interactúan inespecíficamente con el material mediante fuerzas iónicas o de van der Waals, y posteriormente se establecen uniones específicas entre las proteínas adsorbidas en su superficie y los receptores celulares. La interacción entre osteoblastos y sus precursores mesenquimales con proteínas de MEC esta mediada principalmente por receptores transmembrana de la familia de las integrinas [Siebers y col. 2005]. Estas proteínas están formadas por subunidades α y β unidas mediante enlaces no covalentes que interactúan con secuencias específicas de aminoácidos presentes en las proteínas de la MEC. Entre ellas se encuentran la FN, que contiene la secuencia de aminoácidos RGD o el colágeno tipo I que presenta el motivo GFOGER [García 2005, Heino y col. 2009]. El dominio extracelular de las integrinas es responsable de la unión a las proteínas de la MEC, mientras que su dominio citoplasmático interactúa con el citoesqueleto a través de distintas moléculas de señalización (Fig. 4).

La unión de las integrinas a secuencias motivo de proteínas de la MEC promueve su agrupación y la formación de complejos supramoleculares, denominados contactos focales, que interactúan con el citoesqueleto. La formación de estos complejos conduce a la activación de distintas moléculas y vías de señalización fundamentales para la supervivencia, la proliferación y la maduración celular. Los contactos focales unen el citoesqueleto y la MEC a través de proteínas adaptadoras como vinculina, talina y paxilina, proporcionan a la célula integridad estructural y facilitan su expansión y migración [Burridge y col. 1988, Zimerman y col. 2004, Bershadsky y col. 2006]. Entre las rutas de señalización moduladas por estos complejos destacan las vías activadas por FAK (quinasa de adhesión focal) tales como las GTPasas (guanosina trifosfatasa) de la familia de Rho, ERK (quinasas reguladas por señales extracelulares) o JNK (quinasas c-Jun N-terminal) [Siebers y col. 2005]. A través del proceso de adhesión las células detectan las propiedades del ambiente extracelular y son capaces de desencadenar una respuesta celular específica.

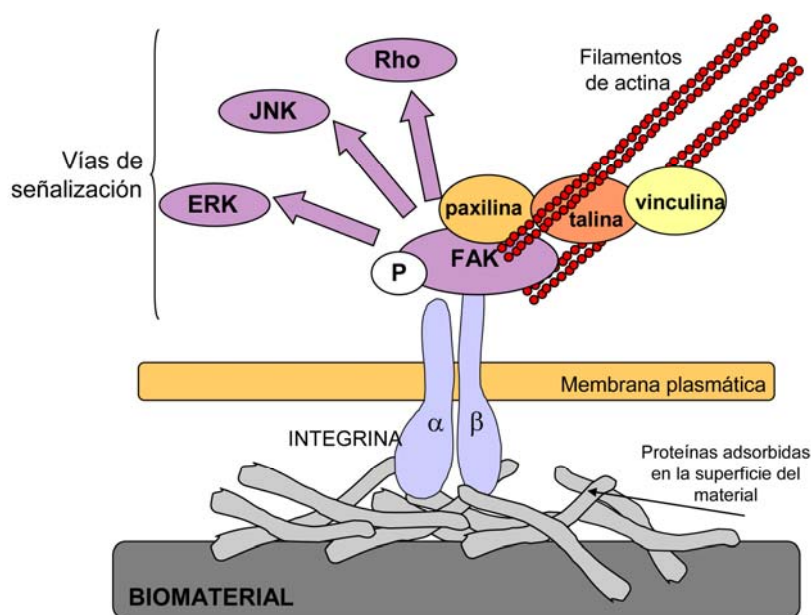


Figura 4. Representación esquemática de las principales vías de señalización activadas por las integrinas tras la adhesión a la MEC. Las cascadas de señalización intermedias se han omitido.

Múltiples evidencias en la literatura indican que es posible modular la adhesión de células osteoformadoras a la superficie del implante mediante el control de sus propiedades superficiales, tales como rigidez, composición química y topografía [Discher y col. 2005, Vogel y Sheetz 2006, Smith y col. 2010]. Así, se ha observado que las diferencias en la composición química de copolímeros basados en polietilén glicol controlan la morfología y la adhesión de células osteoblásticas sobre su superficie [Smith y col. 2010]. Por otro lado, se ha detectado un aumento en la adhesión de osteoblastos sobre superficies nanoestructuradas de Ti, Ti64, y CoCrMo en comparación con superficies lisas de estos materiales [Webster y Ejiófor 2004].

Como se ha mencionado anteriormente, el proceso de adhesión regula el ensamblaje del esqueleto celular. El citoesqueleto constituye el soporte estructural de la célula, organiza espacialmente su contenido, la conecta física y químicamente con el ambiente extracelular y genera fuerzas que le permiten adoptar distintas morfologías y desplazarse [revisado en Fletcher y Mullins 2010]. Para llevar a cabo estas funciones, el citoesqueleto coordina las actividades de un gran número de proteínas y orgánulos citoplasmáticos. Los principales componentes del citoesqueleto son los filamentos de actina, también conocidos como fibras de estrés, los microtúbulos y los filamentos intermedios. Estas tres estructuras se encuentran generalmente formando redes de filamentos que presentan una buena resistencia a la deformación, y son capaces de reorganizarse en respuesta a señales externas. Datos existentes en la literatura sugieren que la reorganización que adopta el citoesqueleto sobre un biomaterial en función de sus características superficiales puede determinar el comportamiento celular a largo plazo. En este sentido, Dalby y col. (2005) detectaron un

aumento en la expresión de citoquinas implicadas en la proliferación celular, incluyendo CRF2-4 (receptor de citoquinas clase II), TGF- α (factor de crecimiento transformante) y del receptor 2 del TNF (factor de necrosis tumoral) en fibroblastos cultivados sobre superficies que promueven la expansión celular. Sin embargo, tras cultivar las células sobre sustratos que inhiben su expansión se detectó una disminución en la expresión de la α -actinina, proteína implicada en la proliferación celular. Por otro lado, algunos autores han observado que el proceso de diferenciación celular puede ir acompañado de cambios en la morfología celular [McBeath y col. 2004]. En concreto, se ha detectado que células MSC con morfología fibroblastoide adoptan una morfología poligonal tras su inducción hacia linaje condrogénico [Zhou y col. 2006]. Asimismo, células progenitoras endoteliales con morfología alargada adquieren un aspecto cuboidal durante el proceso de maduración [Asahara y col. 1997]. Recientemente, Killian y col. (2010) observaron que las características geométricas del sustrato son capaces de modular la diferenciación de MSC hacia los linajes osteogénico o adipogénico, dependiendo de la contractilidad celular que inducen.

La combinación de DLC con polímeros antiadherentes como PTFE o PDMS conduce a la formación de recubrimientos con distintas composiciones químicas que podrían modular la respuesta celular. En este trabajo quisimos analizar el efecto que ejercen los recubrimientos híbridos de DLC sobre distintas funciones celulares tales como la adhesión, la proliferación y la supervivencia celular. Por otra parte, se desconoce si la generación de topografías ordenadas con dimensiones controladas en la aleación Ti64 condiciona el proceso de adhesión y el comportamiento de células osteoblásticas y precursoras humanas a largo plazo. Por ello, nos propusimos estudiar si superficies anisotrópicas de la aleación Ti64 regulan el ensamblaje del citoesqueleto y la morfología de estos tipos celulares y si en último término, condicionan su maduración celular.

3.2. Alineación por contacto. GTPasas Rho

La orientación celular juega un papel crucial en la microarquitectura de muchos tejidos, dictando su función biológica. En el hueso se ha observado que los osteoblastos se disponen linealmente a lo largo de la matriz ósea. Esta distribución ordenada de las células osteoformadoras está controlada por el esqueleto celular, y condiciona la secreción de proteínas colágenas y no colágenas de un modo orientado y organizado [Lomri y Marie 1996]. Como se ha descrito anteriormente, la generación de superficies que mimeticen la estructura ordenada del hueso es una estrategia prometedora para estimular la osteointegración de un implante. Diferentes autores han investigado el desarrollo de topografías ordenadas capaces

de promover la orientación celular [Teixeira y col. 2003, Karuri y col. 2004]. En este sentido se ha observado que las células que crecen sobre sustratos con topografías anisotrópicas modifican su orientación adaptándose a la geometría del sustrato, en un fenómeno denominado “orientación por contacto” (del inglés “contact guidance”) [Weiss 1945]. Diversos tipos celulares entre los que se incluyen fibroblastos, osteoblastos, células endoteliales y epiteliales, son capaces de orientarse cuando se cultivan sobre superficies anisotrópicas con dimensiones laterales en los rangos nanométrico y submicrométrico [Lenhert y col. 2005, Lu y col. 2008, Ricci y col. 2008]. Además, se ha detectado que este fenómeno varía en función del tipo celular y de las dimensiones de la topografía [Teixeira y col. 2003, Karuri y col. 2004, Loesberg y col. 2007, Crouch y col. 2009]. En cuanto a los efectos biológicos de la orientación por contacto, se ha observado que los sustratos que promueven una disposición celular ordenada favorecen la adhesión de células MSC así como su diferenciación al linaje osteogénico [Dalby y col. 2006b].

Como se ha comentado anteriormente, la organización del citoesqueleto está regulada por proteínas localizadas en los focos de adhesión. La formación de contactos focales conduce a la activación de diversas moléculas implicadas en la transducción de señales, entre las cuales se incluyen las GTPasas Rho. Estas proteínas pertenecen a la superfamilia de proteínas Ras y existen en tres isoformas altamente homólogas (A, B y C). Las GTPasas Rho funcionan como interruptores moleculares, ciclando entre un estado inactivo, en el cual se encuentran unidas a GDP, y un estado activo, unidas a GTP. El intercambio de GDP por GTP, y por tanto la activación o inactivación de esta proteína, está regulado catalíticamente por factores de intercambio de nucleótidos conocidos como GEFs (factores de intercambio de nucleótidos de guanina), GAPs (proteínas activadoras de GTPasas) y GDIs (inhibidores de la disociación de nucleótidos de guanina) [Jaffe y Hall 2005]. Las GTPasas Rho conectan a los receptores de membrana con múltiples rutas de señalización intracelular y son esenciales para la organización del citoesqueleto de actina. De hecho se ha observado que la sobreexpresión de Rho en fibroblastos induce la formación de fibras de estrés [Ridley y Hall 1992, Wheeler y Ridley 2004]. Además, las GTPasas de la familia de Rho participan en el control de la polaridad celular y de la dinámica de los microtúbulos así como en la regulación del transporte vesicular a través de la membrana celular [Ettiene-Maneville y Hall, 2002]. Aunque sus tres isoformas presentan una homología estructural de un 85%, existen diferencias en sus funciones. RhoA juega un papel clave en la regulación de la contractilidad celular así como en los procesos de migración celular, RhoB está implicada en la regulación del tráfico vesicular y la supervivencia celular, y RhoC participa en los procesos de motilidad celular [Wheeler y Ridley 2005].

RhoA ejerce sus funciones a través de la activación de diversos efectores, entre los que destacan mDia y ROCK (quinasa asociada a Rho) (Fig. 5). La proteína mDia modula tanto la polimerización de actina a través de un mecanismo dependiente de profilina como la estabilización de los microtúbulos durante la migración celular [revisado en Goode y Eck 2007]. La quinasa ROCK se une a múltiples sustratos entre los que destacan MLCK (quinasa de cadena ligera de miosina), LIMK (Lim quinasa) y las proteínas ERM (de la familia ezrina, radixina y moesina). La activación de MLCK favorece la fosforilación de la miosina de cadena ligera (MLC), que al activarse promueve la contractilidad celular. Por otra parte, la activación de LIMK, que fosforila e inhibe a la cofilina, promueve en último término la polimerización de actina y miosina. Además, ROCK fosforila también a las proteínas ERM que posibilitan la unión de la actina a la membrana plasmática [Schwartz 2004].

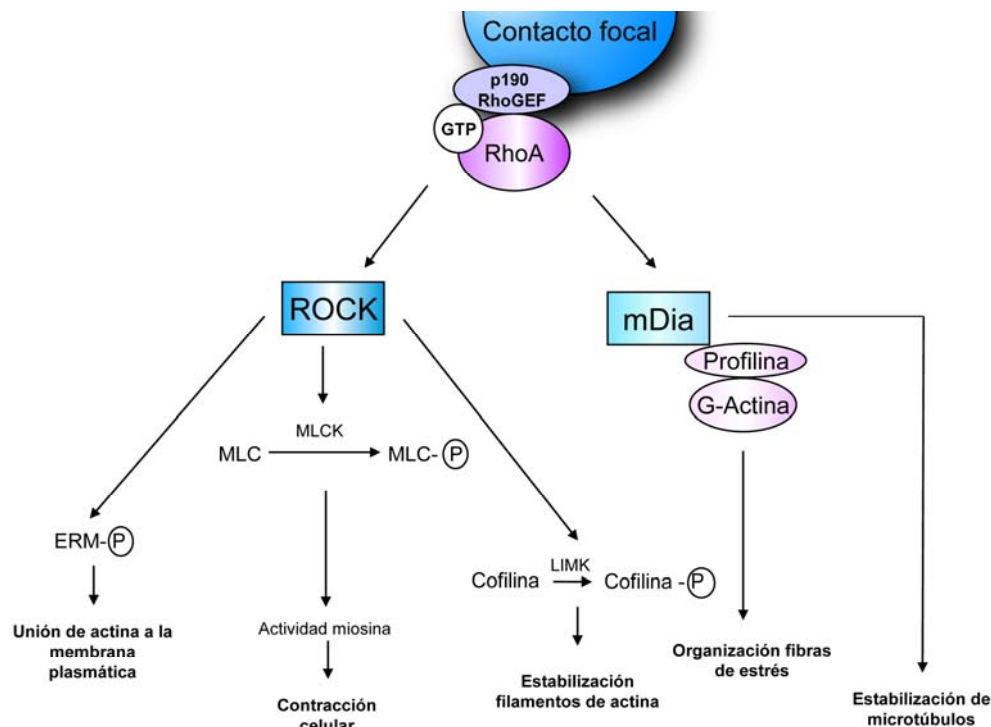


Figura 5. Representación esquemática de las principales vías de señalización activadas por la GTPasa RhoA implicadas en el control del citoesqueleto. Sólo se muestran las vías de señalización mediadas por la activación de ROCK y mDia y sus principales efectores.

La modificación de la aleación Ti64 mediante abrasión mecánica conduce a la formación de superficies anisotrópicas con crestas y valles con distintas dimensiones laterales, en los rangos nano, submicrométrico o micrométrico. Datos disponibles en la literatura indican que topografías ordenadas de Ti64 de orden micrométrico modulan la orientación de osteoblastos humanos, que se alinean siguiendo la dirección de los surcos [Anselme y col.

2002]. Sin embargo, los mecanismos celulares implicados en este proceso no han sido esclarecidos. Como se ha descrito anteriormente, la GTPasa RhoA desempeña funciones esenciales necesarias para mantener la integridad estructural de la célula en respuesta a estímulos externos a través de su efector ROCK, y en otros tipos celulares está implicada en la alineación por contacto sobre sustratos con topografías definidas [Provenzano y col. 2008, Rajnicek y col. 2008]. Debido a ello, consideramos de interés estudiar si la vía de señalización RhoA/ROCK está implicada en la alineación de células osteoblásticas y precursoras sobre superficies de Ti64 anisotrópicas en los rangos nanométrico y submicrométrico.

OBJETIVOS

En base a los antecedentes expuestos, los objetivos propuestos para el desarrollo de este trabajo fueron los siguientes:

1. Evaluar el efecto de recubrimientos híbridos DLC-PDMS-h o DLC-PTFE-h sobre la funcionalidad de células osteoformadoras y precursoras mesenquimales humanas.
2. Evaluar el efecto de topografías ordenadas de la aleación Ti64 generadas mediante abrasión mecánica sobre el proceso de adhesión y orientación por contacto de células osteoformadoras y precursoras mesenquimales humanas.
3. Determinar la participación de la vía de señalización RhoA/ROCK en la orientación de células osteoformadoras y precursoras mesenquimales humanas sobre topografías ordenadas de la aleación Ti64 generadas mediante abrasión mecánica.
4. Evaluar el efecto de topografías ordenadas de la aleación Ti64 generadas mediante abrasión mecánica sobre la capacidad de proliferación de células osteoformadoras y precursoras mesenquimales humanas, así como en la maduración hacia las vías osteogénica y adipogénica de las células precursoras.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. FABRICACIÓN DE LAS MUESTRAS

Las superficies basadas en DLC fueron generadas y caracterizadas por los siguientes grupos: Grupo de Diamantes del Instituto de Investigación ORTON en Helsinki, Departamento de Física de la Universidad de Kuopio, Departamentos de Medicina y de Otorrinolaringología del Hospital Universitario Central de Helsinki y Hospital COXA para el Reemplazo Articular en Tampere, todos ellos en Finlandia. Los recubrimientos con base de DLC se depositaron formando una película de unos 300-400 nm de espesor sobre sustratos de silicio monocristalino de 15 cm de diámetro y 0,5 mm de espesor (Okmetic Oy, Vantaa, Finlandia). Los sustratos se limpiaron mediante sonicación en acetona y etanol. Para garantizar una buena adhesión de los recubrimientos, los sustratos se bombardearon previamente en vacío con argón mediante pulverización catódica (Argon 5,0, Oy Ab AGA, Espoo, Finlandia). Los recubrimientos de DLC de alta calidad y libres de hidrógeno se depositaron sobre el sustrato mediante un sistema de deposición por arco pulsado (FPAD), en un vacío de 10^{-4} Pa. Con el fin de optimizar la adhesión al sustrato y obtener una relación de sp^3 alrededor de un 80%, se llevó a cabo una deposición de alta energía seguida de otra de baja energía [Lappalainen y col. 1998, Tiainen 2001, Lappalainen y col. 2005]. Los recubrimientos se prepararon empleando cátodos de alta pureza de grafito (> 99,9% C, Carbone Lorraine, París, Francia). Este mismo grafito se combinó con PDMS o con PTFE (Irpola Oy, Turku, Finlandia) para la deposición de recubrimientos híbridos, denominados DLC-h. Estos recubrimientos fueron depositados utilizando una unidad de deposición modificada, adaptada para la producción de películas de DLC-PTFE-h y DLC-PDMS-h [Anttila y col. 2003, Kiuru y Alakoski 2004]. Durante la deposición, el soporte de silicio se rotó para obtener recubrimientos uniformes. Para los ensayos con cultivos celulares los sustratos recubiertos se prepararon en piezas con una superficie de 10 mm × 10 mm. Previamente a la realización de experimentos con cultivos celulares, las muestras se lavaron con agua destilada, se esterilizaron durante 24 h con luz ultravioleta y se almacenaron hasta su uso.

Las superficies mecanizadas de la aleación Ti64 fueron generadas en el departamento de Metalurgia Física del Centro Nacional de Investigaciones Metalúrgicas (CENIM-CSIC). Se emplearon discos de Ti64 obtenidos a partir de barras de la aleación suministradas por Surgival SL (Valencia, España). Su composición química en porcentaje en masa, tal y como se indica en el certificado de análisis fue la siguiente: 90% Ti, 6% Al y 4% V. Las muestras se desbastaron sucesivamente con papeles de lija de carburo de silicio de grano decreciente y finalmente se pulieron mecánicamente con pasta de diamante de 1 μ m hasta alcanzar un acabado de espejo. Estas superficies pulidas de Ti64 se denominaron PL y se emplearon como superficies control.

Se generaron topografías ordenadas con surcos paralelos de distintas dimensiones en la superficie de la aleación. Para ello, las muestras pulidas se sometieron a un proceso de abrasión mecánica con papel de lija de carburo de silicio. Se emplearon papeles de lija con dos tamaños de grano distintos, uno de 2400 (fino) y otro de 320 (grueso), y las muestras generadas se denominaron G1 y G2 respectivamente. En la última etapa los materiales mecanizados se lavaron bajo un chorro de agua caliente y se sonicaron en etanol. Para los ensayos *in vitro* se emplearon muestras PL, G1 y G2 de 2 mm de espesor y diferentes áreas, dependiendo de los ensayos a realizar. Previamente a la realización de experimentos con cultivos celulares, las muestras se lavaron con agua destilada e isopropanol, se esterilizaron durante 24 h con luz ultravioleta y se almacenaron hasta su uso.

2. CARACTERIZACIÓN DE LOS MATERIALES

La caracterización de los recubrimientos DLC y DLC-h se llevó a cabo por los grupos que generaron los materiales, mencionados en el apartado anterior. Previamente al análisis de sus propiedades superficiales, las muestras se limpiaron con un sonicador, primero en etanol, posteriormente en agua destilada y finalmente se secaron. El aspecto superficial de los recubrimientos se visualizó mediante microscopia electrónica de barrido (MEB) (FEI Company, Brno, República Checa). La rugosidad superficial media (R_a) se determinó mediante microscopia de fuerza atómica (AFM) empleando un microscopio XE-100 (Park Systems, Suwon, Corea). Los valores del ángulo de contacto de las muestras se determinaron con agua destilada y desionizada, utilizando un sistema de medida basado en el empleo de un microscopio óptico Olympus SZ-PT equipado con una cámara digital Olympus Camedia C-3030ZOOM (Olympus Corp., Tokio, Japón). Las imágenes de las gotas de agua se almacenaron y su geometría se analizó empleando el programa de análisis de imágenes “GIMP” (www.gimp.org). Los valores promedio se calcularon a partir de al menos 5 gotas diferentes de 15 μ l. Los valores del ángulo de deslizamiento del agua sobre las superficies se midieron empleando gotas de agua destilada de 20 y 40 μ l. Para ello se empleó un instrumento especialmente diseñado para este fin, consistente en un video-microscopio acoplado a una cámara con un dispositivo de carga acoplada, un prisma y un goniómetro de precisión [Kiuru y Alakoski 2004].

El análisis microestructural de las muestras mecanizadas de la aleación Ti64 se llevó a cabo en el CENIM empleando un microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM-6500-F, Peabody, MA, EE.UU.), equipado con un analizador de energías dispersivas de rayos X (EDX) para el análisis químico (Programa “Rontec EDR288”, Berlín, Alemania). Se obtuvieron

imágenes tanto por electrones secundarios (SEI) como por electrones retrodispersados (BEI) en modo topográfico. El análisis de la topografía se llevó a cabo por el grupo de Superficies e Interfases del Departamento de Física Aplicada de la Universidad de Extremadura. Los valores de R_a se determinaron mediante AFM empleando un microscopio Autoprobe CP (Veeco Instruments, CA, EE.UU.). Asimismo se registraron las líneas de los perfiles topográficos de las superficies a partir de los cuales se obtuvieron los valores promedio de la profundidad y la anchura de los surcos generados, determinándose las dimensiones laterales y verticales de los surcos a partir de 12 imágenes diferentes por muestra. Para investigar las particularidades de la topografía que aparecen de forma periódica, se realizaron las transformadas de Fourier en dos dimensiones (2D) de las imágenes generadas mediante AFM usando una rutina de transformada rápida de Fourier (FFT). Con objeto de obtener los detalles más finos de la topografía, se filtraron estos espectros eliminando las componentes de baja frecuencia manteniendo sólo las de alta frecuencia. A continuación, las características topográficas correspondientes a las componentes de alta frecuencia se recuperaron con una rutina inversa de FFT. La topografía asociada a las componentes de baja frecuencia, que corresponde a las ondulaciones topográficas con mayor amplitud, se obtuvo sustrayendo los perfiles topográficos calculados con las componentes de alta frecuencia de la topografía original. Los datos obtenidos mediante AFM de las muestras de Ti64 fueron procesados y analizados empleando los programas de análisis “Scanning Probe Image Processor” (SPIP) (Image Metrology, Lyngby, Dinamarca) y “Gwyddion” (David Nečas y Petr Klapetek, República Checa).

3. CULTIVOS CELULARES

Para la realización de este trabajo se han empleado células mesenquimales humanas comerciales aisladas de médula ósea (hMSCs) (Cambrex Bio Science, Verviers, Bélgica). Las células se expandieron en un medio de crecimiento que provee el mismo distribuidor y que contiene suero fetal bovino (FBS), L-glutamina, penicilina y estreptomicina. Por otro lado, se establecieron cultivos primarios de células de linaje osteoblástico (hOBs) a partir de hueso trabecular procedente de explantes óseos de pacientes sometidos a artroplastias de rodilla con un intervalo de edad de entre 65 y 80 años. Ninguno de los pacientes presentaba síntomas clínicos o antecedentes de alteraciones metabólicas óseas. El uso de desechos quirúrgicos fue aprobado por el Comité Ético de Investigación del Hospital Universitario La Paz. Los explantes óseos se cultivaron de acuerdo a un método previamente descrito [Saldaña y col. 2005]. Cada cultivo primario se estableció con explantes procedentes de un mismo paciente. Los fragmentos de hueso trabecular se trocearon en piezas de 0,3 a 0,5 cm² y se lavaron

exhaustivamente con tampón fosfato salino (PBS). Los fragmentos se cultivaron en medio DMEM ("Dulbecco's Modified Eagle Medium", Invitrogen, Barcelona, España) suplementado con 15% de FBS, penicilina y estreptomicina (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.). Todos los cultivos celulares se incubaron a 37° C, 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa.

3.1 Caracterización fenotípica de células mesenquimales humanas

Con el fin de verificar su origen mesenquimal y descartar la presencia de precursores hematopoyéticos, se cuantificó la expresión de los marcadores de superficie CD105, CD29, CD44, CD14, CD34 y CD45 en células hMSCs mediante inmunofluorescencia directa acoplada a citometría de flujo. Para ello se sembraron 10³ cel / cm² en placas de 100 mm y se incubaron hasta alcanzar la confluencia. Después de lavar con PBS, las células se recolectaron empleando ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA) al 0,01% en PBS. Para cuantificar la expresión de los distintos marcadores, las células se incubaron con anticuerpos monoclonales acoplados a un reactivo fluorescente: FITC (fluoresceína), PE (ficoeritrina) o APC (aloficocianina) siguiendo las instrucciones del proveedor [Becton Dickinson Biosciences (BDB), CA, EE.UU.]. Después de lavar con PBS, la fluorescencia se determinó mediante citometría de flujo empleando un citómetro FACSCalibur (BDB). Por otro lado, se evaluó la expresión de los factores de transcripción Oct-4 y Sox-2 mediante microscopia confocal. Para la realización de estos ensayos se sembraron 12 × 10³ células / cm² en cámaras de poliestireno (PE) de 8 pocillos y se incubaron en medio de crecimiento durante 24 h. A continuación, las células adheridas se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS durante 20 min y se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0,1% en PBS durante 15 min. Posteriormente las células se incubaron con albúmina sérica bovina (BSA) al 2% en PBS durante 1 h para bloquear las uniones inespecíficas, seguida de una incubación de 1 h con el anticuerpo primario disuelto en BSA al 1% en PBS. Los anticuerpos y la dilución se muestran en la Tabla I. Tras ser lavadas con Tween 20 al 0.05% en PBS, las células se incubaron durante 1 h con un anticuerpo secundario anti-IgG acoplado a un fluorocromo (Molecular Probes Europe BV, Leiden, Holanda) diluido 1:1000 en BSA al 1% en PBS. Las células se examinaron utilizando un microscopio confocal espectral (Leica TCS SPE, Leica Microsystems, Heidelberg, Alemania).

ANTICUERPO PRIMARIO	TIPO	DILUCIÓN	TIEMPO DE INCUBACIÓN	PROVEEDOR	ANTICUERPO SECUNDARIO
Osteocalcina	pAb	1:100	1h	Chemicon, Harrow, Reino Unido	Anti-IgG conejo- Alexa Fluor® 488
Oct-4	mAb	1:50	1 h	Chemicon	Anti-IgG ratón- Alexa Fluor® 488
Sox-2	mAb	1:50	1 h	Chemicon	Anti-IgG ratón- Alexa Fluor® 488

Tabla I. Relación de anticuerpos primarios y secundarios empleados en los ensayos de caracterización celular.
mAb: anticuerpo monoclonal, pAb: anticuerpo policlonal.

Finalmente, se analizó la capacidad de maduración de células hMSCs hacia los linajes osteogénico y adipogénico. Para los ensayos de diferenciación a linaje osteogénico se sembraron 3×10^3 células / cm^2 en placas de 12 pocillos y se incubaron durante 24 h en medio de crecimiento. Para promover la diferenciación osteoblástica, las células se incubaron durante 12 días en medio osteogénico (Cambrex Bio Science) que contiene dexametasona, β -glicerofosfato, ascorbato, FBS, penicilina y estreptomycin. Con el fin de renovar los nutrientes, el medio osteogénico fue sustituido parcialmente cada 3-4 días con medio fresco. Para la visualización de los nódulos minerales, las células se lavaron con PBS, se fijaron con etanol al 70% en agua y se incubaron con rojo de alizarina (Sigma-Aldrich, Madrid, España), a una concentración de 4×10^{-2} M en agua y pH = 4,2 durante 30 min, a temperatura ambiente. Posteriormente las células se lavaron exhaustivamente con PBS y se visualizaron empleando un microscopio invertido (Nikon DIAPHOT-TMD, Amstelveen, Países Bajos). Para los ensayos de diferenciación a linaje adipogénico se sembraron $2,5 \times 10^4$ hMSCs / cm^2 en placas de 12 pocillos y se incubaron durante 24 h en medio de crecimiento. Con el fin de promover la diferenciación adipogénica, las células se incubaron durante 3 días en medio de inducción adipogénico (Cambrex Bio Science) que contiene FBS, L-glutamina, dexametasona, indometacina, insulina, metil isobutil xantina, penicilina y estreptomycin. Posteriormente las células se incubaron en medio de mantenimiento adipogénico (Cambrex Bio Science), que contiene FBS, L-glutamina, insulina y penicilina/ estreptomycin, durante 2 días y se realizaron 3 ciclos de incubación alternando ambos medios. Tras el último ciclo, las células se incubaron en medio de mantenimiento durante 5 días. La formación de vacuolas lipídicas se visualizó mediante tinción con el reactivo “Oil Red O” (Sigma-Aldrich). Para ello, las células previamente lavadas con PBS se fijaron con PFA al 10% en PBS durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron con isopropanol al 60% en agua, se dejaron secar y se incubaron

con una solución de “Oil Red O”. Después de lavar exhaustivamente con agua destilada, las células se visualizaron empleando un microscopio invertido (Nikon DIAPHOT-TMD).

3.2. Caracterización fenotípica de cultivos primarios de células de linaje osteoblástico

La expresión de los factores de transcripción Oct-4 y Sox-2 se evaluó siguiendo el procedimiento detallado en el apartado anterior. Con el fin de analizar su capacidad de mineralización, se sembraron 3×10^3 células / cm^2 en placas de 12 pocillos y se incubaron durante 12 días en medio osteogénico, siguiendo el procedimiento descrito anteriormente, y se visualizaron los nódulos minerales mediante tinción con rojo de alizarina. Adicionalmente, se determinó la expresión, a nivel de proteína, de OC mediante inmunofluorescencia empleando un anticuerpo policlonal (Tabla I). Para ello, se sembraron 3×10^3 células / cm^2 en cámaras de PE de 2 pocillos y se incubaron durante 12 días en medio osteogénico. Tras el periodo de incubación las células se fijaron, permeabilizaron y marcaron como se detalla en el apartado anterior. Finalmente, las células se examinaron utilizando un microscopio confocal espectral (Leica TCS SPE).

4. ENSAYOS DE ADHESIÓN Y PROLIFERACIÓN CELULAR

Para la realización de los ensayos de adhesión celular se sembraron $2,5 \times 10^4$ células / cm^2 en placas de 24 pocillos sobre los materiales ensayados y se cultivaron durante 1, 2 y 4 h. Para los ensayos de proliferación celular se sembraron 4×10^3 células / cm^2 y se cultivaron durante 1, 4 y 7 días. Como criterio para cuantificar las células viables se empleó el reactivo comercial “Alamar Blue” (Biosource, Nivelles, Bélgica), un indicador redox que cambia de color en respuesta a la actividad metabólica. Este colorante se utiliza generalmente para cuantificar la viabilidad de una población celular determinada. Ensayos preliminares llevados a cabo en el laboratorio mostraron que los resultados obtenidos empleando “Alamar Blue” o recuento microscópico de células viables utilizando azul de tripano proporcionan resultados similares. Las células se lavaron con PBS y se incubaron durante 4 h con “Alamar Blue” disuelto al 10% en DMEM libre de rojo fenol. Después de aplicar una excitación a 530 nm, la fluorescencia emitida a 590 nm se cuantificó usando un espectrofluorímetro “Synergy 4” (BioTek Instruments, Winooski, VT, EE.UU.).

5. ENSAYOS DE DIFERENCIACIÓN CELULAR

5.1. Diferenciación a linaje osteoblástico

Para la realización de estos ensayos se sembraron 3×10^3 hMSCs / cm^2 sobre las distintas superficies en placas de 12 pocillos y se incubaron durante 24 h en medio de crecimiento. A continuación las células se incubaron durante 12 días en medio osteogénico como se detalla en el apartado 3. Transcurrido el tiempo de incubación, se recogieron los medios de cultivo, se centrifugaron a 1.200 rpm durante 10 min y se les añadió una mezcla de inhibidores de proteasas conteniendo bacitracina a una concentración final de 50 ng/ml, aprotinina a 2 ng/ml, fluoruro de fenilmetil sulfonilo a $17,4 \times 10^{-3}$ ng/ml y pepstatina A a 1 ng/ml) (Sigma-Aldrich). Las células se lavaron con PBS y se extrajeron las proteínas totales empleando un tampón compuesto por 5×10^{-2} M Tris-HCl (pH 8,0), 5×10^{-1} M NaCl, 1% Tritón X-100 y la misma mezcla de inhibidores de proteasas. Los lisados se centrifugaron a 12.000 rpm durante 10 min. La actividad FA se cuantificó en los extractos celulares mediante la determinación de la liberación de *p*-nitrofenol a partir de *p*-nitrofenilfosfato (Sigma-Aldrich) a 37° C y pH 10,5. La secreción de OPN se determinó en el medio de cultivo empleando un inmunoensayo específico tipo ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) siguiendo las indicaciones del proveedor (R&D Systems, Abingdon, Reino Unido). Los datos de la actividad FA y de la secreción de OPN se normalizaron de acuerdo a la cantidad total de proteínas presentes en las células, cuantificadas empleando un reactivo basado en el método de Bradford (Bio-Rad protein assay, Bio-Rad Laboratories Inc, CA, EE.UU.) y utilizando BSA como estándar.

5.2. Diferenciación a linaje adipogénico

Para cada condición experimental a evaluar se sembraron $2,5 \times 10^4$ hMSCs / cm^2 sobre las distintas superficies en placas de 12 pocillos y se incubaron durante 24 h en medio de crecimiento. A continuación las células se sometieron a 3 ciclos de inducción adipogénica tal y como se detalla en el apartado 3 y se cuantificó la formación de vacuolas lipídicas empleando el reactivo "Oil Red O". Tras su tinción, las células se lavaron exhaustivamente con agua destilada y el colorante se eluyó con isopropanol al 100%. La absorbancia a 510 nm se cuantificó empleando un espectrofluorímetro "Synergy 4".

6. CUANTIFICACIÓN Y ENSAYOS DE ATENUACIÓN DE LAS ACTIVIDADES DE LA GTPASA RHOA Y DE SU EFECTOR ROCK

Para cuantificar las actividades de la GTPasa RhoA y de su efector ROCK sobre los materiales se sembraron 9×10^4 células / cm^2 en discos de 60 mm y se incubaron durante 4 h. Por otro lado, para los ensayos de atenuación de las actividades de RhoA y ROCK se sembraron 9×10^4 células / cm^2 en PE en presencia de transferasa C3 o hidroxifasudil (HF), respectivamente, y se incubaron durante 2 y 24 h. Como control de estos experimentos se emplearon cultivos celulares no tratados, pero sometidos a las mismas manipulaciones experimentales.

Para la atenuación de la actividad GTPasa RhoA se empleó transferasa C3 permeable a la membrana celular a una concentración de 1 mg/ml (Cytoskeleton Inc., Denver, EE.UU.). La actividad de su efector ROCK fue atenuada empleando HF a una concentración de 10^{-6} M (Calbiochem-Merck Biosciences, CA, EE.UU.). Ambos agentes, disueltos en agua destilada y almacenados a -20°C , se añadieron directamente al medio de cultivo celular en el momento de la siembra o 24 h después, hasta alcanzar su concentración final.

La forma activa de RhoA unida a GTP, se cuantificó empleando un kit de activación G-LISA[®] (Cytoskeleton Inc.), similar a un ensayo inmunoenzimático y basado en el empleo de un anticuerpo específico. Transcurridos los tiempos de incubación, las células se lavaron exhaustivamente con PBS y se lisaron en el tampón suministrado con el kit. Los extractos celulares se centrifugaron a 12.000 rpm durante 2 min a 4°C . La actividad RhoA se cuantificó en alícuotas de los lisados celulares, que contenían 25 μg de proteínas totales, siguiendo las instrucciones del fabricante. Para cuantificar la actividad de ROCK, las células se lavaron exhaustivamente con PBS y se lisaron en un tampón compuesto por Tris-HCl 10×10^{-3} M pH 7,5, NaCl $1,5 \times 10^{-1}$ M, glicerol 2-fosfato 1×10^{-3} M, Tritón X-100 1%, EDTA 1×10^{-3} M, EGTA 1×10^{-3} M, Na_3VO_4 1×10^{-3} M y una mezcla de inhibidores de proteasas (Complete, Roche, Barcelona, España). Posteriormente los lisados celulares se sometieron a 3 ciclos de congelación-descongelación, se incubaron 15 min en hielo y se centrifugaron a 12.000 rpm durante 10 min. La actividad de la proteína ROCK se cuantificó en alícuotas de los lisados celulares que contenían 30 μg de proteínas totales, empleando un kit comercial, siguiendo las instrucciones del fabricante (Cell Biolabs Inc., San Diego, CA, EE.UU.). Este ensayo está basado en la detección inmunoenzimática de MYPT1 fosforilada específicamente por ROCK en la treonina 696.

7. MORFOLOGÍA CELULAR Y REORGANIZACIÓN DEL CITOESQUELETO DE ACTINA

Para la realización de estos ensayos se sembraron 1×10^4 células / cm^2 en placas de 24 pocillos sobre los distintos materiales, en presencia o ausencia de C3 o HF, y se incubaron durante los tiempos indicados. La morfología celular se examinó mediante MEB. Para ello, las células adheridas a los materiales se lavaron con PBS y se fijaron con glutaraldehído al 2,5% en PBS durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras se deshidrataron en etanol disuelto en agua a concentraciones crecientes (30-100%), y se secaron mediante punto crítico con CO_2 empleando un dispositivo CPD7501 (Quorum Technology, Reino Unido). Una vez secas, las muestras se recubrieron con oro empleando un equipo Sputter Coater SC510 (Bio-Rad, España) y se examinaron mediante MEB (Inspect FEI, Hillsboro, OR, EE.UU.).

Para la visualización del citoesqueleto de actina, las células adheridas se fijaron con PFA al 4% en PBS y permeabilizaron como se ha descrito en el apartado 3. Posteriormente las células se incubaron con faloidina conjugada con isotiocianato de tetrametil-rodamina (Sigma-Aldrich) disuelta en PBS a 4×10^{-7} M durante 30 min, a temperatura ambiente y en oscuridad. Adicionalmente el ADN nuclear se tiñó con 4,6 diamino 2-fenil-indol (DAPI) (Sigma-Aldrich) a una concentración de 3×10^{-6} M en agua destilada. Las células se examinaron utilizando un microscopio confocal espectral (Leica TCS SPE). Para cuantificar el área celular, se seleccionaron al azar 40 células por muestra a partir de cinco imágenes representativas. Las células se perfilaron manualmente empleando el programa de análisis de imágenes "ImageJ v1.34". La orientación y la elongación celular sobre las superficies de Ti64 se determinaron en un total de 180 células por muestra, seleccionadas al azar a partir de diez imágenes representativas. Las células fueron perfiladas manualmente ajustando cada célula a una elipse. Las dimensiones de los ejes mayor y menor de la elipse representan la longitud y la anchura celular, respectivamente. La elongación se calculó como el resultado de dividir el eje mayor entre el eje menor de la elipse. La orientación de cada célula sobre las superficies se calculó midiendo el ángulo formado por el eje mayor de la elipse y la horizontal, coincidente con la dirección de los surcos.

8. ENSAYOS DE INMUNOFLUORESCENCIA

Para la realización de estos ensayos se sembraron 1×10^4 células / cm^2 en placas de 24 pocillos sobre los distintos materiales, en presencia o ausencia de C3 o HF, y se incubaron durante los tiempos indicados. Las células adheridas se fijaron, permeabilizaron y marcaron mediante inmunofluorescencia tal y como se detalla en el apartado 3. Los anticuerpos empleados se muestran en la tabla II. Para la tinción de la forma activa de caspasa-3, las

células presentes en el medio de cultivo celular se recuperaron mediante centrifugación sobre un portaobjetos de vidrio a 2.000 rpm durante 10 min, usando una citocentrífuga (Shandon Cytospin 2, Runcorn, Reino Unido) y se fijaron, permeabilizaron y tiñeron. Para la visualización de los núcleos, las células se incubaron con DAPI (Sigma-Aldrich). Para la visualización del citoesqueleto de actina las células se incubaron con faloidina conjugada con Alexa-Fluor® 647 (Fluka, Sigma-Aldrich). Las muestras se examinaron utilizando un microscopio confocal espectral (Leica TCS SPE).

ANTICUERPO PRIMARIO	TIPO	DILUCIÓN	TIEMPO DE INCUBACIÓN	PROVEEDOR	ANTICUERPO SECUNDARIO
α acetil-tubulina	mAb	1:100	1 h	Sigma-Aldrich	Anti-IgG ratón- Alexa Fluor® 647/488
β -tubulina	pAb	1:50	1 h	Santa Cruz (Heidelberg, Alemania)	Anti-IgG conejo-Alexa Fluor® 488
Fibronectina	mAb	1:50	1 h	Chemicon	Anti-IgG ratón- Alexa Fluor® 488
Paxilina	mAb	1:200	14 h	BDB	Anti-IgG ratón- Alexa Fluor® 488
Caspasa-3 activa	*pAb	1:10	14 h	Cell Signaling Tech (Beverly, MA, EEUU)	-
RhoA	pAb	1:200	2 h	Abcam (Cambridge, Reino Unido)	Anti-IgG conejo- Alexa Fluor® 488

Tabla II. Relación de anticuerpos primarios y secundarios empleados en los distintos ensayos. mAb: anticuerpo monoclonal, pAb: anticuerpo policlonal. *Anticuerpo primario conjugado con Alexa Fluor® 488

9. ANÁLISIS DE LOS CONTACTOS FOCALES

Para determinar la longitud y la orientación de los contactos focales, las imágenes obtenidas mediante inmunofluorescencia correspondientes a células teñidas con un anticuerpo específico para paxilina se analizaron manualmente utilizando el programa “ImageJ v1.34”. Se midieron un total de 100 contactos focales seleccionados al azar a partir de cuatro imágenes representativas por muestra.

10. ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR

Para la realización de estos ensayos se sembraron 1×10^4 células / cm^2 en placas de 24 pocillos sobre los distintos materiales y se incubaron durante 24 h. Las células adheridas se lavaron con PBS y se incubaron durante 30 min con acetoximetil ester de calceína (calceína-AM, Sigma-Aldrich) a una concentración 8×10^{-3} M y con yoduro de propidio (IP, Sigma-Aldrich) a una concentración 1×10^{-3} M disueltos en medio de cultivo celular, para la tinción de células viables y dañadas, respectivamente. Posteriormente, las células se lavaron con PBS, se fijaron con PFA al 4% en PBS y se visualizaron mediante microscopía confocal espectral (Leica TCS SPE).

11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se llevó a cabo empleando el programa SPSS 9.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU.). Los resultados se expresaron como media \pm desviación estándar (DE). Los datos cuantitativos se analizaron mediante las pruebas de Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney, y se consideró una significación estadística cuando $p < 0,05$. Las comparaciones a posteriori se analizaron aplicando la U de Mann-Whitney, ajustando el valor de p con la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples, y el nivel de significación se fijó en $p < 0,015$.

RESULTADOS

1. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LAS CÉLULAS

En primer lugar se llevó a cabo la caracterización fenotípica de las células empleadas en el presente trabajo. Mediante inmunofluorescencia acoplada a citometría de flujo se evaluó tanto la expresión de marcadores de superficie de células troncales de origen mesodérmico como la ausencia de marcadores característicos de células del linaje hematopoyético en hMSCs. Los resultados obtenidos indican que las células expresan, a nivel de proteína, marcadores típicos de células troncales de origen mesodérmico tales como CD44, CD105 y CD29, mientras que no se detectó expresión de marcadores específicos de linaje hematopoyético como CD34, CD14 y CD45 (Fig. 6 A). Adicionalmente se evaluó la expresión proteica de los factores de transcripción Oct-4 y Sox-2, que juegan un papel clave en el mantenimiento de la pluripotencialidad celular (Fig. 6 B). Mediante microscopia confocal se observó que las células hMSCs expresan Oct-4 y Sox-2. Con el objeto de estudiar su potencial de maduración, las células hMSCs se cultivaron en medios definidos que promueven su diferenciación hacia los linajes osteoblástico y adipogénico (Fig. 6 C). Tras el cultivo en medio osteogénico se observó que las células elongadas indiferenciadas adquirieron aspecto cuboidal y se agruparon formando estructuras ricas en calcio, detectadas mediante tinción con rojo de alizarina, dejando espacios libres en la monocapa celular. Por otra parte, tras la incubación en medio adipogénico las células adoptaron una morfología redondeada y se observó la formación de vesículas de grasa en el interior celular mediante el empleo del reactivo “Oil Red O”. Como cabría esperar, la expresión de los factores Oct-4 y Sox-2 fue indetectable en cultivos primarios de hOBs (datos no mostrados). Con el fin de analizar su fenotipo osteoblástico, los hOBs se incubaron en medio osteogénico y se evaluó la formación de nódulos minerales (Fig. 6 D). La tinción con rojo de alizarina reveló la formación de estructuras ricas en calcio, características de la matriz ósea mineralizada. Además, se observó que los hOBs secretan OC, proteína específica de osteoblastos maduros (Fig. 6 E). Cabe destacar que la tinción de OC reveló la presencia de estructuras en forma de anillo hexagonal localizadas en la matriz extracelular.

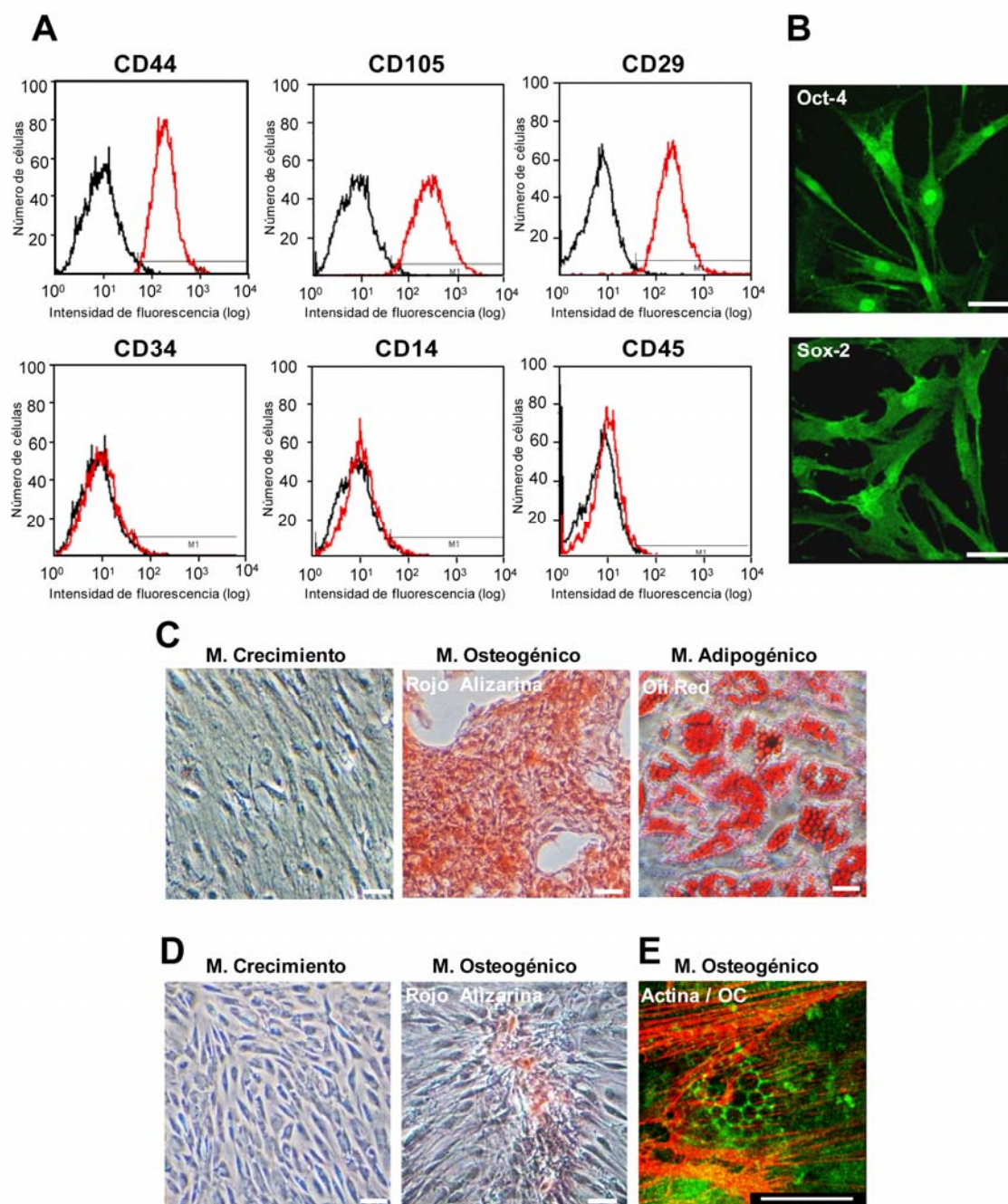


Figura 6. Caracterización fenotípica de hMSCs y hOBs. (A) Análisis de la expresión de marcadores de superficie en hMSCs. Los histogramas de fluorescencia muestran la distribución relativa del número de células en función de la intensidad de fluorescencia en el control negativo (negro) y en las células incubadas en presencia de anticuerpos específicos (rojo). Se muestra el resultado representativo de tres experimentos independientes con resultados similares. (B) Tinción de Oct-4 y Sox 2 (verde) en hMSCs. (C) Diferenciación de hMSCs a linajes osteogénico y adipogénico. Las células se cultivaron en medio de crecimiento o bien en medio de inducción osteogénico o adipogénico. Las imágenes muestran la formación de nódulos minerales mediante tinción con rojo de alizarina y de las vesículas lipídicas mediante tinción con "Oil red O". (D) Visualización de nódulos minerales mediante tinción con rojo de alizarina en hOBs cultivados en medio de crecimiento o en medio osteogénico. (E) Tinción de actina (rojo) y osteocalcina (verde) en hOBs cultivados en medio osteogénico. Imágenes representativas de tres experimentos independientes con resultados similares. Barra = 50 μ m.

2. EFECTO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA SUPERFICIAL DE RECUBRIMIENTOS BASADOS EN CARBONO TIPO DIAMANTE SOBRE LA RESPUESTA CELULAR

En los últimos años, se ha investigado activamente el desarrollo de recubrimientos duros que mejoren el comportamiento de los implantes ortopédicos frente al desgaste y la corrosión, y que a su vez permitan obtener una respuesta celular controlada. En este apartado hemos investigado el comportamiento de osteoblastos primarios y sus precursores mesenquimales sobre superficies basadas en DLC con distintas composiciones químicas. Para ello se emplearon recubrimientos de DLC puros y recubrimientos híbridos de DLC funcionalizados con PDMS o PTFE.

2.1. CARACTERIZACIÓN DE LOS RECUBRIMIENTOS DE DLC Y DLC-h

La topografía de los recubrimientos de DLC y DLC-h se caracterizó mediante MEB (Fig. 7). Las superficies mostraron un aspecto homogéneo con ausencia de irregularidades, independientemente de la composición química del recubrimiento. Los valores de rugosidad superficial media (R_a) fueron inferiores a 10 nm en todas las muestras ensayadas (Tabla III).

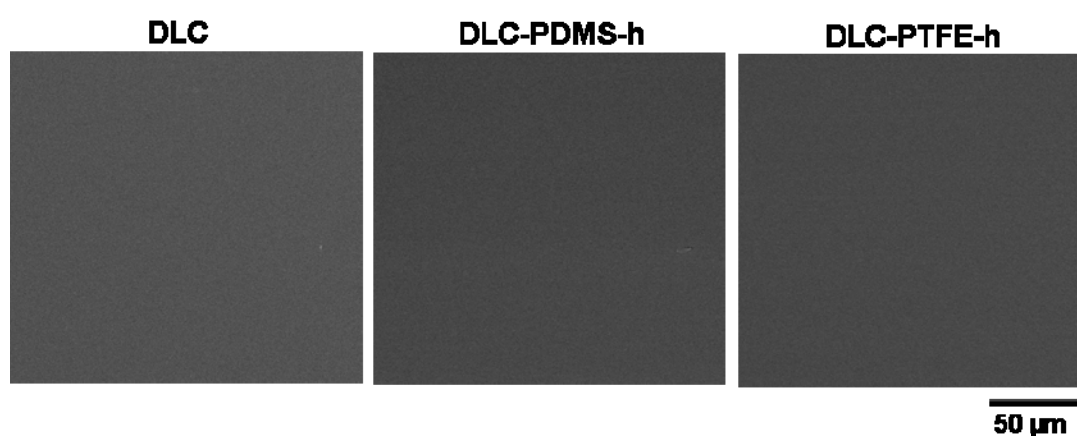


Figura 7. Aspecto superficial de los recubrimientos DLC y DLC-h. Barra = 50 μ m.

A continuación se determinaron los valores del ángulo de contacto (θ_w) y el ángulo de deslizamiento ($^\circ$) para el agua sobre los recubrimientos. El ángulo de contacto se define como el ángulo que forma la tangente a la superficie del agua con la superficie sólida en el punto de contacto. Por su parte, el ángulo de deslizamiento se define como el ángulo crítico de una superficie sólida inclinada en la que una gota de agua de un volumen definido comienza a desplazarse [Kamitani y Teranishi 2003]. Los datos mostrados en la tabla III indican que ambos recubrimientos híbridos exhibieron valores de θ_w similares y superiores a los detectados sobre

los recubrimientos de DLC ($p < 0,05$). Estos resultados indican que los cambios en la composición química de los recubrimientos híbridos aumentan la hidrofobicidad del DLC definida por el ángulo de contacto. Por otro lado, la afinidad de los materiales por el agua definida por el ángulo de deslizamiento fue diferente en los tres recubrimientos ensayados. La inclinación que necesitó una gota de 20 μl de agua destilada para deslizarse sobre el recubrimiento de DLC-PDMS-h fue menor de 1° . Por el contrario, para inducir movimiento sobre el recubrimiento de DLC-PTFE-h el volumen de la gota de agua destilada se tuvo que incrementar hasta 40 μl y el ángulo de inclinación hasta 90° . Por último, sobre los recubrimientos de DLC, los valores del ángulo de deslizamiento fueron 80° y 35° para gotas de 20 y 40 μl , respectivamente. En conjunto, estos resultados indican que los recubrimientos DLC-PDMS-h presentan propiedades repelentes hacia el agua.

Material	Ra (nm)	Θ_w ($^\circ$)	(°)	
			20 μl	40 μl
DLC	$0,64 \pm 0,12$	$66 \pm 1,5$	80	35
DLC-PDMS-h	$1,21 \pm 0,14$	$102 \pm 1,5$	<1	<1
DLC-PTFE-h	$2,01 \pm 0,16$	$106 \pm 1,5$	-	90

Tabla III. Valores de rugosidad superficial media (Ra) y de ángulos de contacto (Θ_w) y deslizamiento ($^\circ$) del agua en los distintos materiales. Los datos mostrados en la tabla representan la media \pm DE de cinco determinaciones independientes para cada superficie.

2.2. EFECTO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS RECUBRIMIENTOS EN EL PROCESO DE ADHESIÓN CELULAR

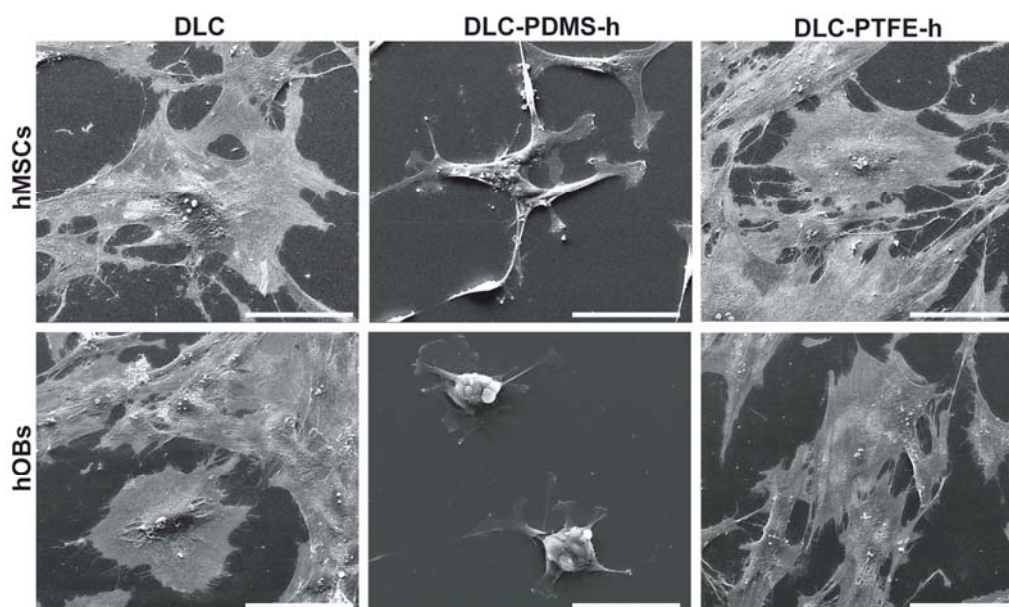
En este apartado quisimos investigar la influencia de la composición química de los recubrimientos de DLC y DLC-h sobre diferentes parámetros que caracterizan el proceso de adhesión celular, como son la morfología celular, la reorganización del citoesqueleto y el área celular.

2.2.1. Efecto de la composición química de los recubrimientos sobre la morfología celular

En primer lugar se examinó mediante MEB la morfología que exhiben las células cuando se cultivan sobre los recubrimientos basados en DLC. Las imágenes mostraron células bien adheridas y expandidas sobre los recubrimientos de DLC y DLC-PTFE-h, independientemente del tipo celular ensayado (Fig. 8 A). Por el contrario, las pocas células adheridas a recubrimientos de DLC-PDMS-h mostraron una estructura densa e irregularmente contraída con vesículas en su superficie. En ambos tipos celulares se observó la formación de

protrusiones citoplasmáticas o lamelipodios, con un gran número de filopodios en sus extremos (Fig. 8 B).

A



B

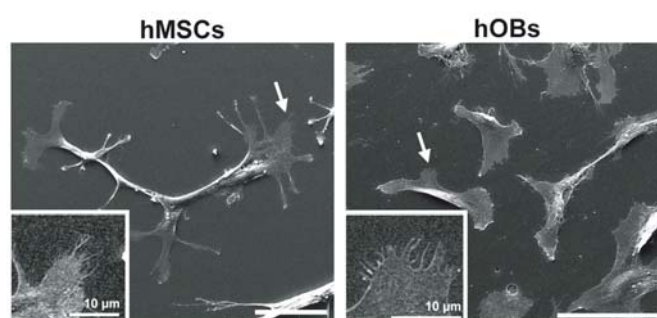


Figura 8. Morfología celular sobre los recubrimientos de DLC y DLC-h. (A) Las imágenes obtenidas mediante MEB muestran la morfología de células cultivadas durante 24 h sobre las superficies. Imágenes representativas de tres experimentos independientes con resultados similares. (B) Detalles de las extensiones citoplasmáticas, indicadas por flechas, de células cultivadas sobre los recubrimientos DLC-PDMS-h. Barra = 100 µm.

2.2.2. Efecto de la composición química de los recubrimientos sobre la reorganización del citoesqueleto de actina

A continuación se evaluó la capacidad de las células para reorganizar su citoesqueleto de actina tras su incubación durante 24 h sobre las superficies ensayadas (Fig. 9). Sobre las muestras de DLC y DLC-PTFE-h ambos tipos celulares presentaron una morfología alargada con

el citoesqueleto de actina organizado en fibras de estrés bien definidas, distribuidas paralelamente entre sí y en su mayoría orientadas a lo largo del eje longitudinal de la célula. Mediante tinción con DAPI se observó la presencia de núcleos con morfología normal, sin signos de condensación. Por el contrario, las escasas células adheridas a los recubrimientos de DLC-PDMS-h mostraron una morfología poco extendida con el citoesqueleto de actina muy desorganizado, independientemente del tipo celular. La tinción con DAPI reveló signos de condensación y fragmentación nuclear.

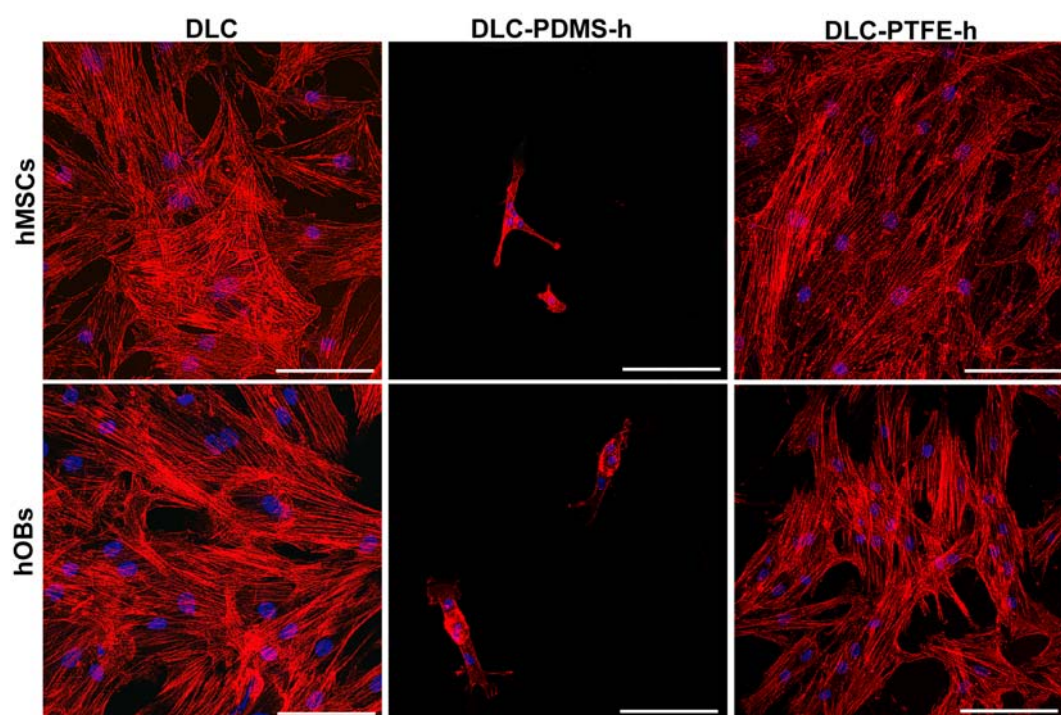


Figura 9. Reorganización del citoesqueleto de actina de células cultivadas sobre los recubrimientos de DLC y DLC-h. Tinción de actina (rojo) y núcleos (azul) en células cultivadas durante 24 h sobre las superficies. Imágenes representativas de tres experimentos independientes con resultados similares. Barra = 100 μ m.

2.2.3. Efecto de la composición química de los recubrimientos sobre la reorganización del citoesqueleto de tubulina

Con el fin de evaluar el efecto de los diferentes recubrimientos sobre la reorganización del citoesqueleto de tubulina, las células cultivadas durante 24 h sobre las superficies se tiñeron empleando un anticuerpo específico para tubulina acetilada, característica de microtúbulos estables (Fig. 10). Sobre los recubrimientos de DLC y DLC-PTFE-h el patrón de distribución de la tubulina acetilada fue similar. En ambos tipos celulares, se observó una red tubular interconectada con una organización radial desde la región perinuclear hacia la

periferia celular. Por el contrario, sobre las superficies de DLC-PDMS-h las células presentaron microtúbulos altamente desorganizados, independientemente del tipo celular ensayado.

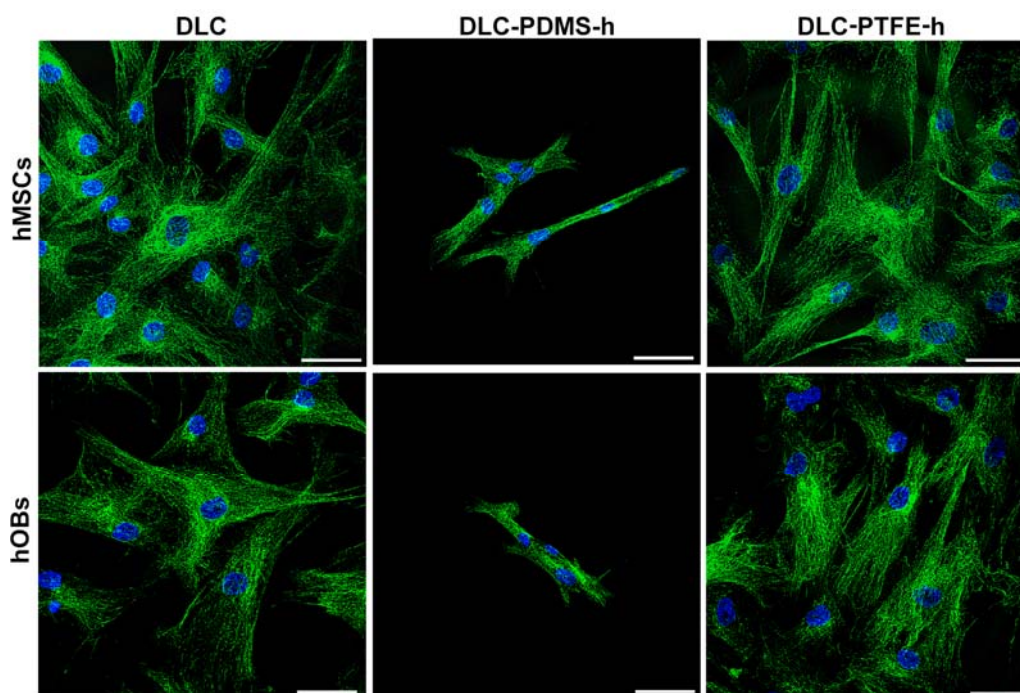


Figura 10. Reorganización de microtúbulos en células cultivadas sobre los recubrimientos de DLC y DLC-h. Tinción de tubulina acetilada (verde) y núcleos (azul) en células cultivadas durante 24 h sobre las superficies. Imágenes representativas de tres experimentos independientes con resultados similares. Barra = 50 μm .

2.2.4. Efecto de la composición química de los recubrimientos sobre el área celular

Por último se cuantificó el área celular sobre las distintas superficies (Fig. 11). El área celular sobre los recubrimientos DLC-PDMS-h fue notablemente inferior a la detectada en células cultivadas sobre las películas de DLC y DLC-PTFE-h en las que fue similar, independientemente del tipo celular ensayado.

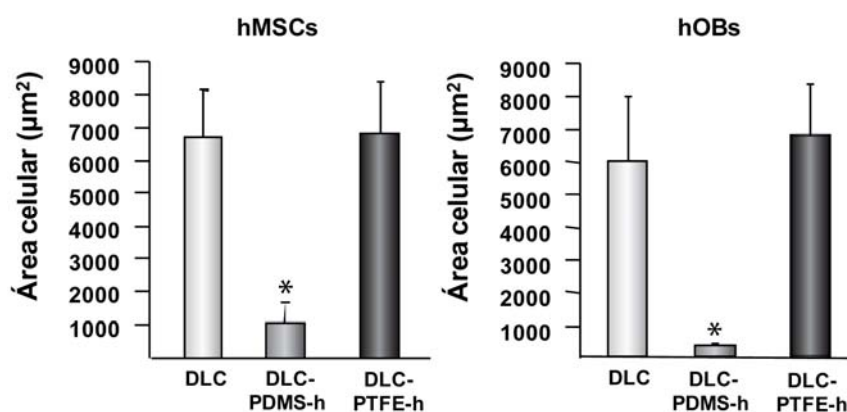


Figura 11. Área celular sobre los recubrimientos de DLC y DLC-h. Las células se cultivaron durante 24 h sobre las superficies. Los resultados representan la media \pm DE del área celular determinada en 40 células seleccionadas al azar en cada tipo de muestra. * $p < 0,015$ en comparación con DLC y DLC-PTFE-h.

Tomados en conjunto, estos datos indican que la composición química de los recubrimientos de DLC y DLC-h modula el proceso de adhesión de células hMSCs y hOBs. En concreto se ha observado que los recubrimientos híbridos de teflón permiten la adhesión celular mientras que los de silicona la dificultan.

2.3. EFECTO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS RECUBRIMIENTOS SOBRE LA VITALIDAD CELULAR

Ya que las superficies de DLC-PDMS-h alteran la morfología celular y dificultan el proceso de adhesión, a continuación nos propusimos investigar el efecto de la química superficial de los recubrimientos sobre la viabilidad celular, la activación de los mecanismos de muerte celular programada y la proliferación celular.

2.3.1. Efecto de la composición química de los recubrimientos sobre la viabilidad celular

Para evaluar la influencia de la composición de los recubrimientos sobre la viabilidad celular se empleó la pareja de fluorocromos calceína-AM/IP. La calceína en su forma acetometil éster (AM) es permeable a la membrana celular y no emite fluorescencia. Tras acceder al citoplasma celular los grupos éster son hidrolizados por esterasas celulares dando lugar a su forma fluorescente, calceína. Por otro lado, el PI es un compuesto fluorescente que, cuando la membrana celular está dañada, es capaz de intercalarse en la doble cadena de DNA. En ambos tipos celulares, la incubación con calceína-AM reveló la presencia de células viables sobre las superficies de DLC y DLC-PTFE-h (Fig. 12). Además, la ausencia de tinción inducida por el IP indicó que estas células no presentaban daño en su membrana celular (Fig. 12). Las escasas células que se encontraron adheridas a las superficies de DLC-PDMS-h mostraron tinción nuclear tras su incubación con PI, indicando daño celular y pérdida de la integridad de su membrana. En algunos casos, este marcaje positivo para IP apareció asociado a tinción positiva de calceína en forma de granulado.

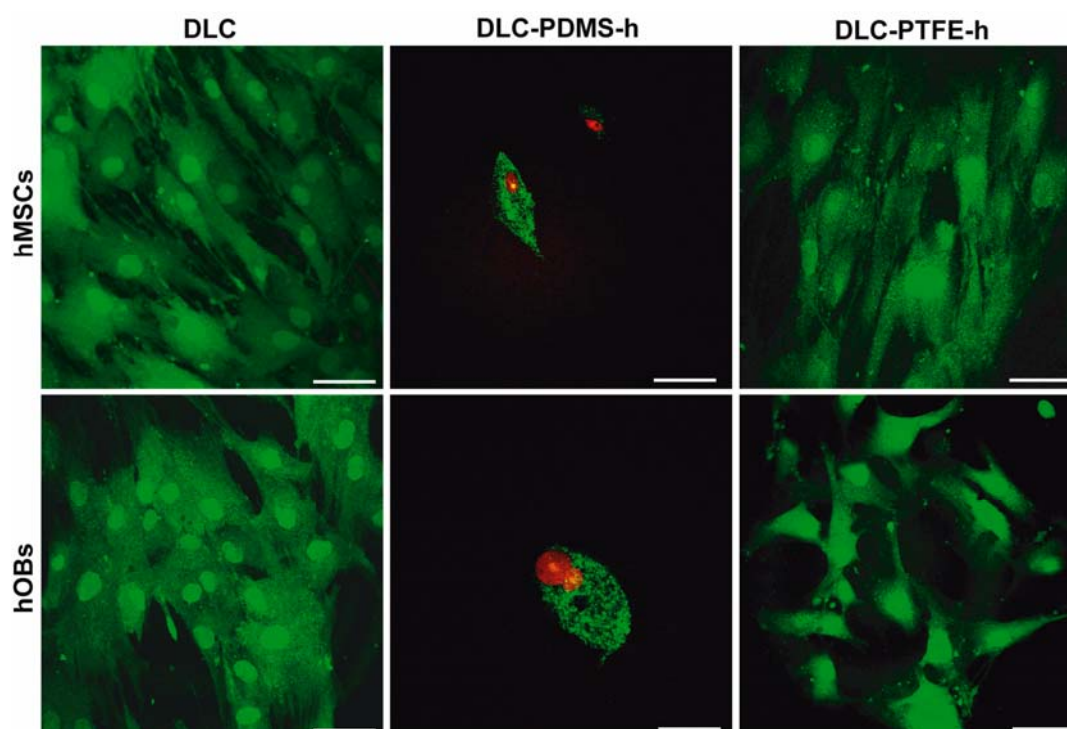


Figura 12. Viabilidad celular sobre los recubrimientos de DLC y DLC-h. Tinción con calceína-AM (verde) e IP (rojo) en células cultivadas durante 24 h sobre las superficies. Imágenes representativas de tres experimentos independientes con resultados similares. Barra = 50 μ m.

2.3.2. Efecto de la composición química de los recubrimientos sobre la expresión de la forma activa de la caspasa-3

A continuación quisimos investigar si las células incubadas sobre los recubrimientos de DLC-PDMS-h expresaban, a nivel de proteína, la forma activa de la caspasa-3, uno de los principales ejecutores de la apoptosis en células somáticas [Thornberry y Lazebnik 1998, Porter y Jänicke 1999]. Las imágenes muestran que tanto las células hMSCs como los hOBs cultivados sobre superficies de DLC-PDMS-h expresaron la forma activa de la caspasa-3 (Fig. 13 A). Por el contrario, no se observó tinción positiva en células cultivadas sobre los recubrimientos de DLC y DLC-PTFE-h. Cuando se analizaron las células presentes en el medio de cultivo incubado en presencia de los recubrimientos DLC-PDMS-h, se encontraron agregados multicelulares, marcados positivamente para la forma activa de la proteína (Fig. 13 B). Sin embargo, prácticamente no se detectaron células en los medios de cultivo incubados en presencia de los recubrimientos de DLC o DLC-PTFE-h, y en ningún caso se observó tinción positiva para esta molécula (datos no mostrados).

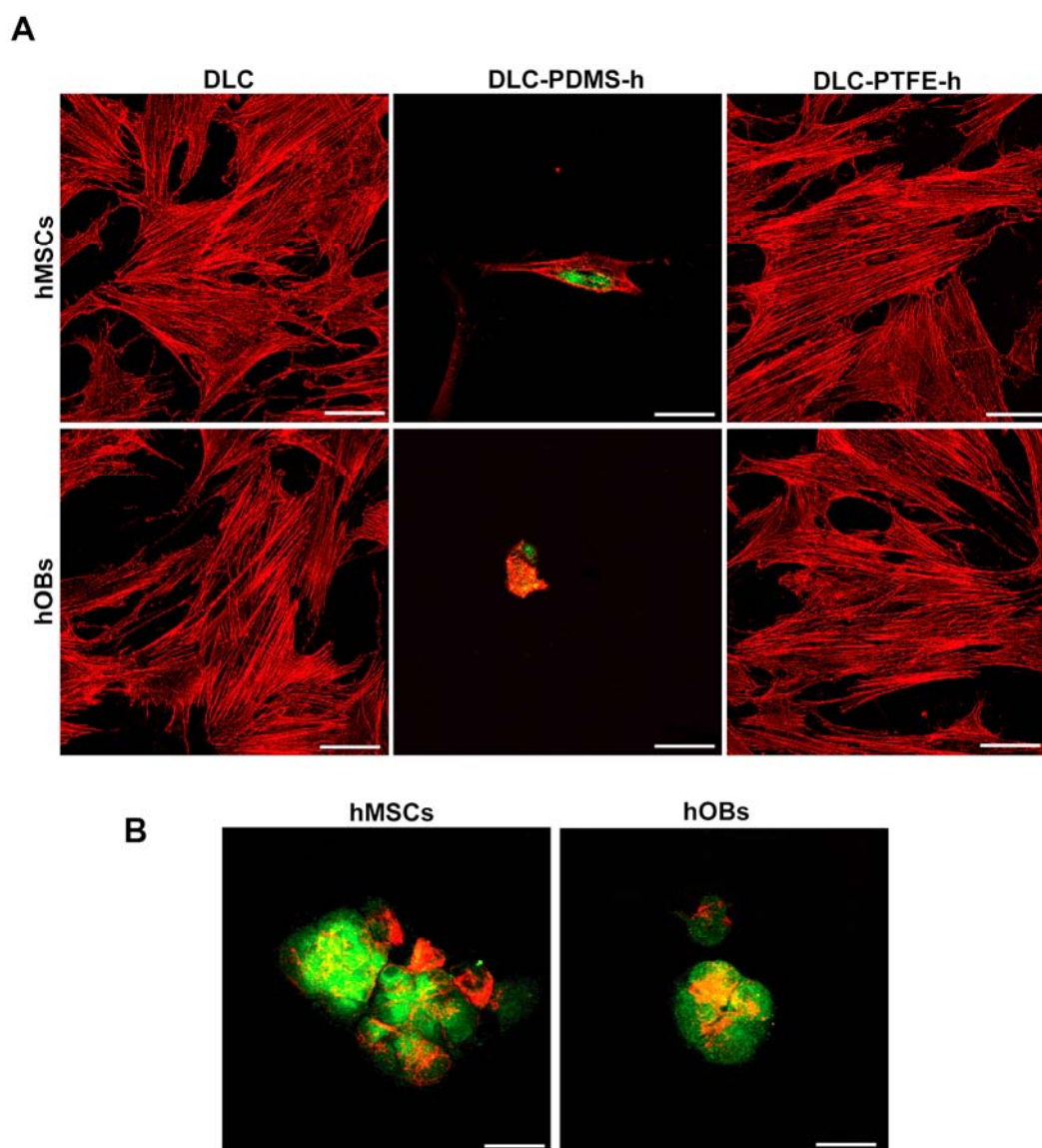


Figura 13. Expresión de la forma activa de la caspasa-3 en células cultivadas sobre los recubrimientos de DLC y DLC-p-h. Tinción de la forma activa de caspasa-3 (verde) y actina (rojo). (A) Células cultivadas durante 24 h sobre las superficies ensayadas. (B) Células presentes en el medio de cultivo celular (recubrimientos DLC-PDMS-h). Imágenes representativas de tres experimentos independientes con resultados similares. Barra = 50 μ m.

2.3.3. Efecto de la composición química de los recubrimientos sobre la proliferación celular

Finalmente, quisimos evaluar si la composición química influye en la capacidad de proliferación de células hMSCs y hOBs sobre los recubrimientos. Los datos mostrados en la figura 14 indican que el número de células viables sobre los recubrimientos DLC-PDMS-h fue notablemente inferior que sobre los de DLC o DLC-PTFE-h a todos los tiempos ensayados. En ambos tipos celulares, la proliferación celular incrementó a lo largo del tiempo sobre los recubrimientos DLC así como sobre los recubrimientos DLC-PTFE-h (Fig. 14). Por el contrario, el

número de células viables sobre las superficies de DLC-PDMS-h permaneció constante en el caso de los hOBs y en el caso de hMSCs disminuyó con el tiempo.

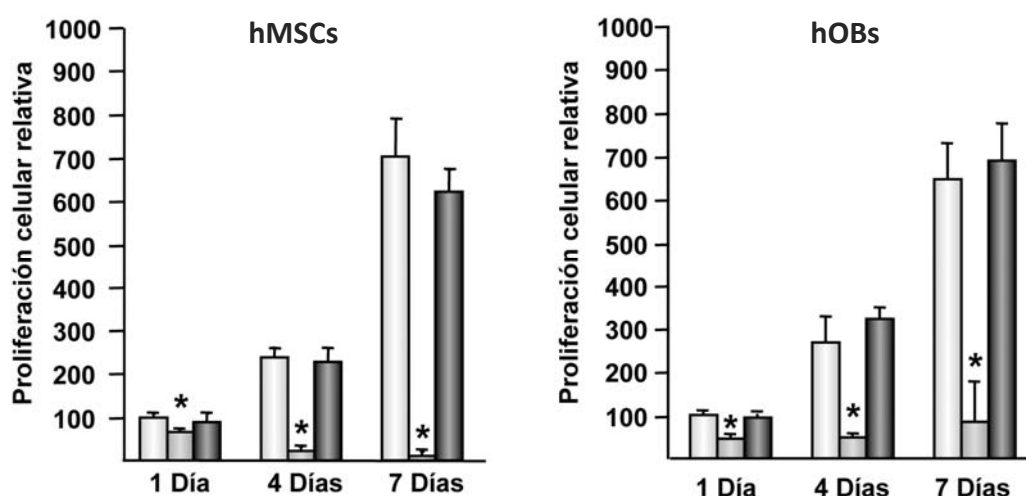


Figura 14. Proliferación celular sobre los recubrimientos de DLC y DLC-p-h. Las células se cultivaron durante 1, 4 y 7 días sobre las superficies DLC (□), DLC-PDMS-h (▒) y DLC-PTFE-h (■). Los resultados obtenidos se expresan como el porcentaje de fluorescencia correspondiente a las muestras DLC después de 1 día de cultivo, a la que se asignó un valor arbitrario de 100. Cada valor representa la media \pm DE de cuatro experimentos independientes, con resultados similares. * $p < 0,015$ en comparación con DLC y DLC-PTFE-h, dentro de un mismo tiempo.

En conjunto, estos resultados indican que la composición química de los recubrimientos basados en DLC modula el proceso de adhesión celular así como el mantenimiento de la viabilidad de células hMSCs y hOBs. Mientras que los recubrimientos de DLC y DLC-PTFE-h permiten la adhesión y proliferación celular sobre su superficie, las películas de DLC-PDMS-h dificultan estos procesos e inducen apoptosis a través de la expresión de la forma activa de la caspasa-3.

3. EFECTO DE LA TOPOGRAFÍA ORDENADA DE LA ALEACIÓN Ti64 SOBRE LA RESPUESTA CELULAR

El hueso es un tejido altamente organizado, formado por unidades estructurales que comprenden tamaños desde la escala nanométrica hasta la micrométrica, lo que le confiere unas propiedades mecánicas únicas. En el tejido óseo, la alineación de las células y de la MEC de colágeno es esencial para el desempeño de sus funciones mecánicas y biológicas. En este apartado quisimos estudiar el comportamiento de células precursoras mesenquimales y osteoblastos humanos sobre topografías ordenadas de la aleación Ti64 generadas mediante abrasión mecánica.

3.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS SUPERFICIES MODIFICADAS DE LA ALEACIÓN Ti64 MEDIANTE ABRASIÓN MECÁNICA

El aspecto superficial de las muestras se caracterizó mediante MEB (Fig. 15 A). Las superficies pulidas mostraron un aspecto homogéneo con ausencia de irregularidades, en el que se podía distinguir una estructura bifásica consistente en zonas brillantes discontinuas, correspondientes a la fase β , embebidas en una matriz oscura formada por la fase α . El examen de las muestras mecanizadas reveló la formación de surcos paralelos que se alinean a lo largo de la dirección de desbaste. Cabe señalar que las fases α y β no se visualizaron en las muestras mecanizadas ya que la señal obtenida por los cambios topográficos enmascara la emitida a consecuencia de diferencias en la composición química. Se descartó la posible contaminación de la superficie con micropartículas abrasivas después de un examen detallado de estas imágenes (datos no mostrados). A partir de imágenes obtenidas mediante AFM se extrajeron líneas del perfil topográfico de las muestras y se determinaron la profundidad y el ancho de los surcos (Fig. 15 B). Sus valores se resumen en la Tabla IV. Como era de esperar, los surcos de las superficies G2 fueron más amplios y profundos que los de las muestras G1. El análisis de frecuencias no pudo aplicarse a la topografía de las superficies G1 al no presentar simetría, por lo que sólo se muestra su topografía original (Fig. 15 C). En el caso de las superficies G2, se detectaron dos niveles topográficos claramente diferenciados, uno correspondiente a los surcos más amplios, y otro de pequeñas irregularidades de la superficie, probablemente causadas por imperfecciones en los materiales empleados en el proceso de abrasión mecánica (Fig. 15 D). La imagen original (superior) corresponde a la suma de las otras dos imágenes (intermedia e inferior). Ambos niveles topográficos mostraron un alto grado de direccionalidad. A continuación se determinaron los valores de R_a para las distintas superficies

(Tabla IV). En función de los valores de R_a las muestras PL se clasificaron como pulidas con $R_a \approx 3.3$ nm, las G1 como nanométricas con $R_a \approx 58$ nm y las G2 como submicrométricas con $R_a \approx 200$ nm.

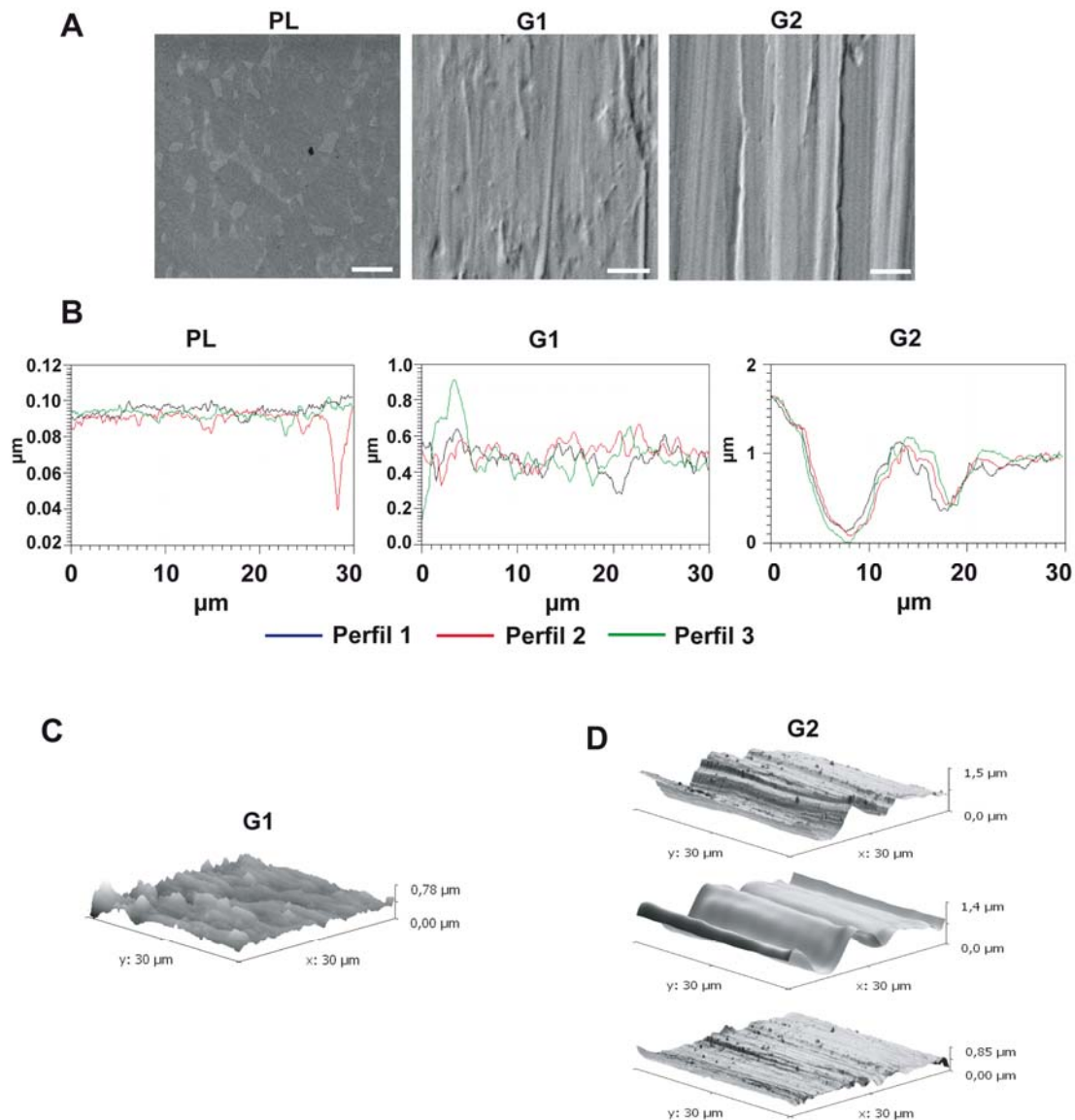


Figura 15. Caracterización superficial de las muestras de Ti64 modificadas topográficamente. (A) Imágenes obtenidas mediante MEB del aspecto superficial de las muestras PL (electrones secundarios) y mecanizadas (electrones retrodispersados). (B) Perfiles topográficos de las tres superficies obtenidos mediante AFM. (C) Topografía de las superficies G1. (D) Descomposición espectral de las superficies G2. La imagen superior muestra la topografía original de las muestras, la imagen intermedia muestra la componente topográfica de baja frecuencia y la inferior la de alta frecuencia.

MATERIAL	Ra (nm)	Surcos	
		Profundidad (μm)	Amplitud (μm)
PL	$3,3 \pm 0,7$	-	-
G1	$58 \pm 7,0$	$0,15 \pm 0,09$	$2 \pm 0,90$
G2	$200 \pm 65,0$	$0,95 \pm 0,30$	$9 \pm 4,00$

Tabla IV. Valores de rugosidad superficial media (Ra), profundidad y amplitud de los surcos de las muestras de Ti64 modificadas topográficamente. Los datos mostrados en la tabla representan la media \pm DE de cinco determinaciones independientes para cada superficie.

La composición química de las superficies se obtuvo mediante análisis por EDX. Los datos mostrados en la tabla V indican que el proceso de mecanizado no altera la composición superficial de las muestras.

Elemento*	PL	G1	G2
O	<1	<1	<1
Ti	88	87	87
Al	9	10	10
V	3	3	3

Tabla V. Composición química de las muestras de Ti64 modificadas topográficamente. Los datos mostrados en la tabla representan la media \pm DE de cinco determinaciones independientes para cada superficie. *Los resultados se expresan como el porcentaje atómico.

3.2. EFECTO DE LA TOPOGRAFÍA ORDENADA DE LA ALEACIÓN Ti64 EN LOS PROCESOS DE ORIENTACIÓN POR CONTACTO

Datos existentes en la literatura indican que las superficies anisotrópicas pueden inducir una respuesta celular conocida como alineación por contacto [Monsees y col. 2005, Loesberg y col. 2007]. Este fenómeno tiene lugar durante el proceso de adhesión celular y puede determinar la respuesta de las células al implante a largo plazo. En este apartado quisimos investigar la influencia de topografías ordenadas de la aleación Ti64, con rugosidades promedio en los rangos nanométrico y submicrométrico, en los procesos de adhesión y orientación de hMSCs y hOBs.

3.2.1. Efecto de la topografía ordenada de la aleación Ti64 sobre la cinética de adhesión celular

Ya que el proceso de reparación ósea depende en gran medida de una correcta adhesión de las células a la superficie del implante, en este apartado quisimos investigar el

efecto de las modificaciones en la topografía de la aleación Ti64 sobre la cinética de adhesión celular. Los datos obtenidos muestran que el porcentaje de adhesión aumentó con el tiempo de incubación en las tres superficies ensayadas ($p < 0,015$), independientemente del tipo celular examinado (Fig. 16). El número de hMSCs adheridas a las superficies mecanizadas tras 1 h de incubación fue mayor que sobre las muestras PL. Además, se observó un incremento en el porcentaje de adhesión sobre superficies G2 en comparación con muestras PL al cabo de 2 h en cultivo. Tras 4 h de incubación, el porcentaje de hMSCs adheridas fue similar en los tres materiales ensayados. Por otro lado, el proceso de abrasión mecánica no modificó la cinética de adhesión de hOBs sobre la aleación Ti64 a ninguno de los tiempos ensayados.

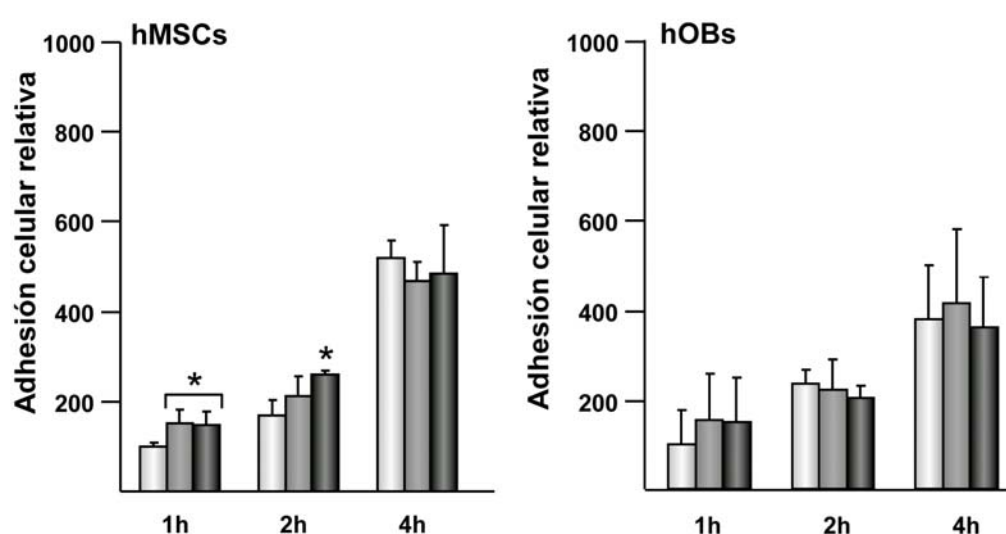


Figura 16. Cinética de adhesión celular sobre las superficies de Ti64 modificadas topográficamente. Las células se cultivaron durante 1, 2 y 4 h sobre las superficies PL (□), G1 (▒) y G2 (■). Los resultados obtenidos se expresan como el porcentaje de fluorescencia correspondiente a las muestras PL tras 1 h de cultivo, a la que se asignó un valor arbitrario de 100%. Cada valor representa la media \pm DE de cuatro experimentos independientes, con resultados similares. * $p < 0,015$ comparado con muestras PL, dentro de un mismo tiempo.

3.2.2. Efecto de la topografía ordenada de la aleación Ti64 sobre la morfología, reorganización del citoesqueleto de actina y orientación celular

Con el fin de investigar si las superficies de Ti64 mecanizadas inducen alineación por contacto, se evaluaron los cambios en la morfología de células cultivadas durante 24 h sobre los materiales. Las imágenes obtenidas mediante MEB revelaron la presencia de células expandidas sobre las superficies pulidas, mientras que sobre las superficies mecanizadas las células exhibieron una morfología más alargada, independientemente del tipo celular examinado (Fig. 17 A). Se cuantificó la elongación celular y los datos obtenidos indicaron que los hOBs presentan un grado mayor de elongación sobre las superficies mecanizadas que sobre

las pulidas. En el caso de las células hMSCs, sólo se encontraron diferencias significativas respecto al control sobre las superficies G2 (Fig. 17 B).

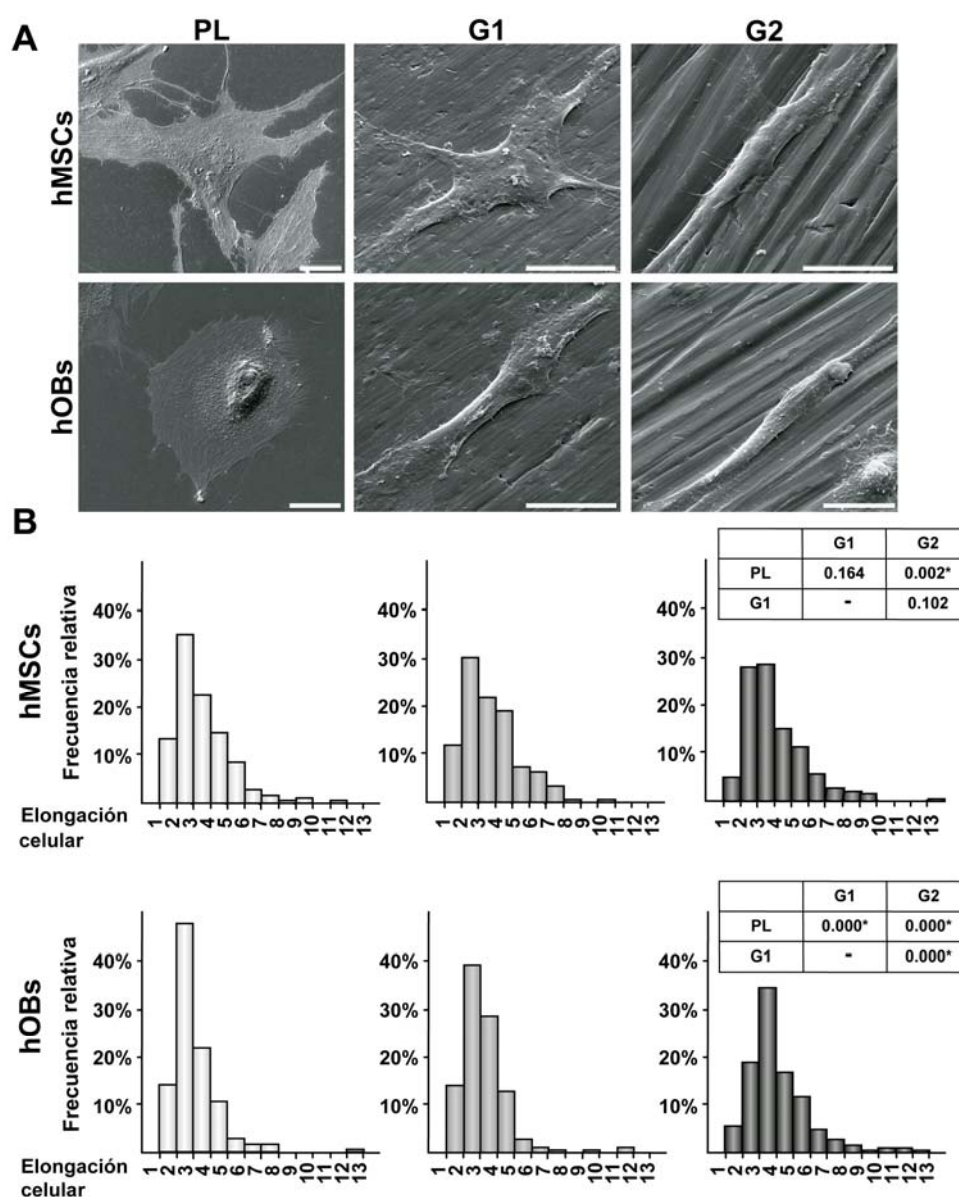


Figura 17. Morfología y elongación celular sobre las superficies de Ti64 modificadas topográficamente. (A) Las imágenes obtenidas mediante MEB muestran la morfología de células cultivadas durante 24 h sobre las superficies. Barra = 20 μ m. (B) Los histogramas de frecuencia relativa muestran la elongación celular tras 24 h de incubación sobre las muestras PL (\square), G1 (\blacksquare) y G2 (\blacksquare). Los cuadros mostrados a la derecha recogen los valores de p obtenidos a partir del análisis estadístico de los datos. * $p < 0,015$.

A continuación, quisimos investigar si los cambios morfológicos observados sobre las superficies mecanizadas estaban asociados a modificaciones en la orientación celular. Las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal indican que las células tienden a orientarse en la dirección de los surcos tanto en las superficies nanométricas como en las superficies submicrométricas (Fig. 18 A). Sobre las superficies PL, las células se disponen sin

una orientación definida, independientemente del tipo celular ensayado. En todos los casos se observó un citoesqueleto de actina organizado en fibras de estrés bien definidas distribuidas a lo largo de las células. Sobre las superficies G1 y G2 las fibras de estrés se orientaron en la dirección los surcos. Para cuantificar el grado de orientación celular sobre las superficies, se determinó el ángulo que forma el eje mayor de las células con la horizontal (Fig. 18 B). Sobre las muestras mecanizadas se observó que ambos tipos celulares se orientan en la dirección de los surcos siendo el grado de orientación mayor sobre las superficies G2.

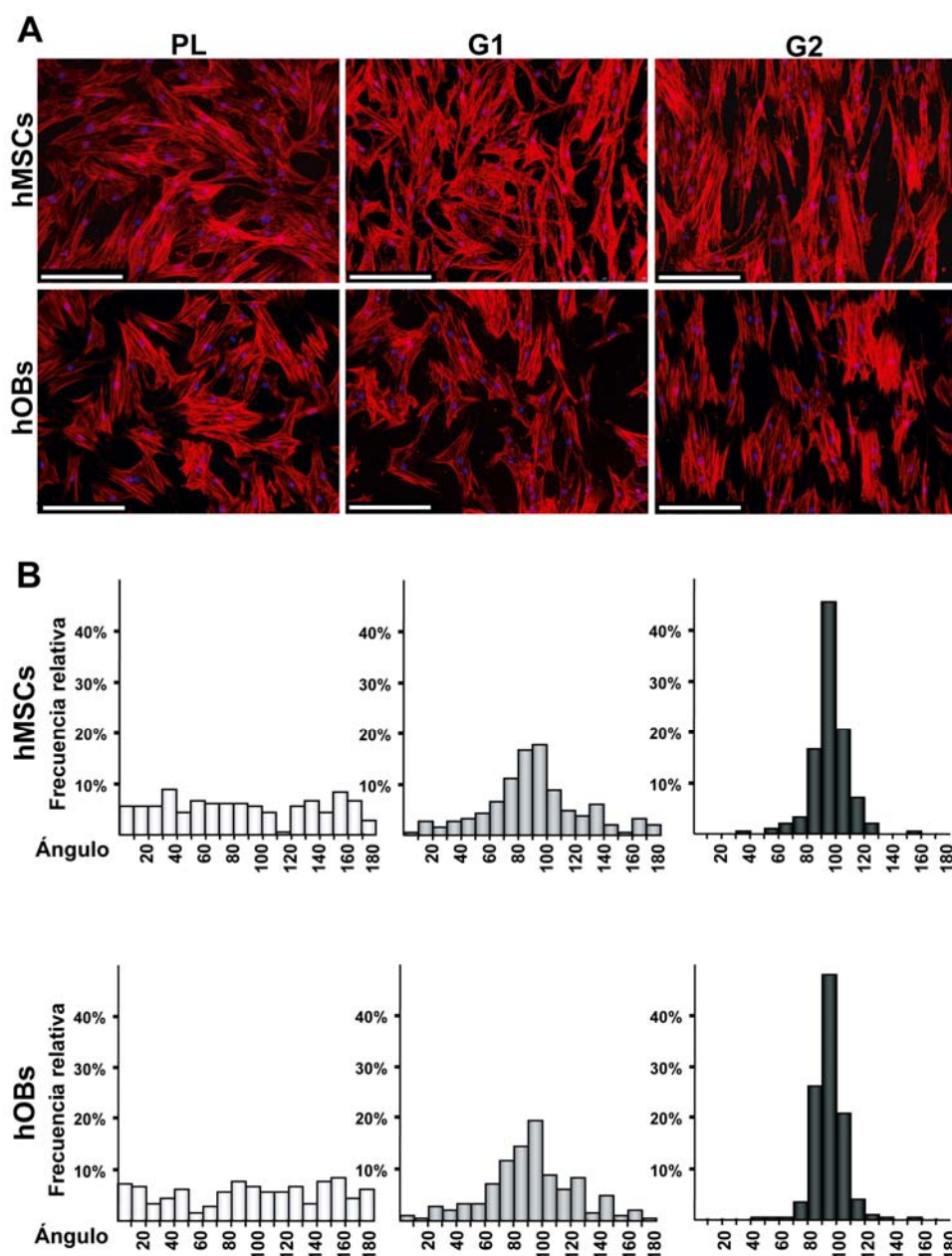


Figura 18. Orientación celular sobre las superficies de Ti64 modificadas topográficamente. (A) Tinción de actina (rojo) y núcleos (azul) en células cultivadas durante 24 h sobre las superficies. Imágenes representativas de tres experimentos independientes con resultados similares. Barra = 250 μ m. (B) Los histogramas de frecuencia relativa muestran la orientación celular sobre las muestras PL (\square), G1 (\blacksquare) y G2 (\blacksquare). La orientación de los surcos en las superficies G1 y G2 corresponde a 90° con la horizontal.

Finalmente se observó que a pesar de inducir cambios en la elongación y orientación celular, el proceso de mecanizado no altera el área celular de ninguno de los tipos celulares estudiados (Fig. 19).

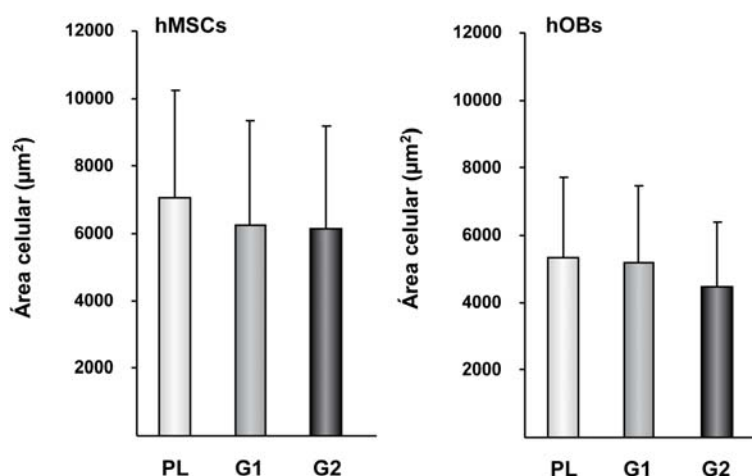


Figura 19. Área celular sobre las superficies de Ti64 modificadas topográficamente. Las células se cultivaron durante 24 h sobre las superficies. Los resultados representan la media \pm DE del área celular determinado en 40 células seleccionadas al azar en cada tipo de muestra.

3.2.3. Efecto de la topografía ordenada de la aleación Ti64 en la organización de la fibronectina

La FN es una glicoproteína adhesiva presente en forma insoluble en la matriz extracelular del hueso. Su correcta disposición en fibrillas es posible gracias a una adecuada reorganización de los filamentos de actina. Con el fin de evaluar si el proceso de mecanizado altera la formación de fibrillas de FN, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia mediante marcaje simultáneo de FN y actina sobre las distintas superficies. Las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal revelan que el proceso de mecanizado no alteró el ensamblaje de las fibrillas de FN en células cultivadas durante 24 h sobre la aleación. Se identificó que la formación de fibrillas de FN ocurre preferentemente en dirección paralela a los filamentos de actina del citoesqueleto, independientemente de la superficie y el tipo celular estudiado (Fig. 20). Sobre las superficies mecanizadas, la fibrillas de FN se orientaron de acuerdo con la topografía del sustrato, mientras que sobre las superficies PL se dispusieron aleatoriamente.

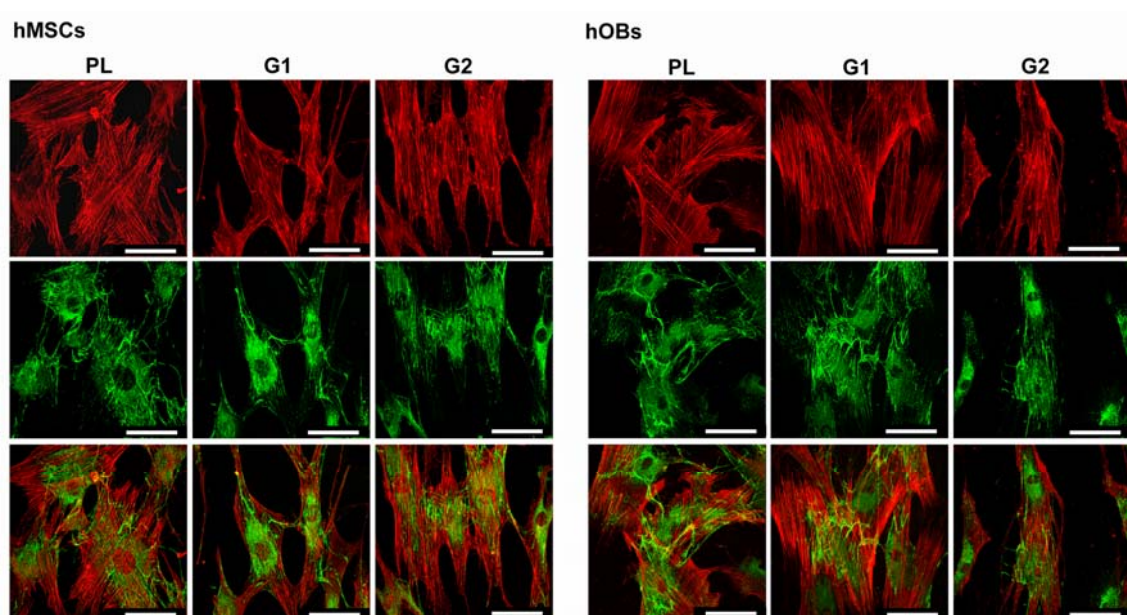


Figura 20. Distribución de fibronectina en células cultivadas sobre las superficies de Ti64 modificadas topográficamente. Tinción de actina (rojo) y FN (verde) en células cultivadas durante 24 h sobre las distintas superficies. Imágenes representativas de tres experimentos independientes con resultados similares. La orientación de los surcos en las superficies G1 y G2 corresponde a 90° con la horizontal. Barra = 50 μ m.

Tomados en conjunto, estos resultados indican que las superficies mecanizadas de la aleación Ti64 favorecen la adhesión de hMSCs a tiempos cortos mientras que no alteran la de hOBs. Además la topografía anisotrópica del material determina la orientación y la elongación celular, así como la organización de actina y FN en ambos tipos celulares.

3.3. ESTUDIO DE LOS MECANISMOS IMPLICADOS EN EL PROCESO DE ORIENTACIÓN CELULAR SOBRE TOPOGRAFÍAS ORDENADAS DE LA ALEACIÓN Ti64

Los resultados obtenidos en el apartado anterior indican que las superficies submicrométricas (G2) de la aleación Ti64 promueven notablemente la alineación por contacto en células precursoras y osteoblastos, mientras que este efecto es menos evidente sobre las superficies nanométricas (G1). Por este motivo, se seleccionaron las superficies G2 para investigar en detalle los mecanismos implicados en la orientación por contacto sobre superficies anisotrópicas de la aleación Ti64. Ya que el fenómeno de orientación por contacto tiene lugar a tiempos muy tempranos del proceso de adhesión, las células se incubaron sobre las superficies PL y G2 durante periodos de hasta 4 h y se examinó la formación de proyecciones citoplasmáticas (lamelipodios y filopodios), la organización de filamentos proteicos del citoesqueleto (actina y tubulina) y la distribución de los contactos focales.

3.3.1. Formación de prolongaciones celulares durante el proceso de orientación celular sobre topografías ordenadas de la aleación Ti64

Durante el proceso de adhesión las células desarrollan lamelipodios y filopodios que les permiten desplazarse sobre el sustrato [Ridley y col. 2003]. Los lamelipodios son prolongaciones transitorias de la membrana celular producidas por la acción de microfilamentos de actina, que presentan estructura ancha y forma laminar. Los filopodios son proyecciones citoplasmáticas delgadas que se extienden desde el extremo directriz de células en migración. En este apartado quisimos investigar el efecto de las superficies ordenadas de la aleación Ti64 sobre la formación de filopodios y lamelipodios durante el proceso de alineación por contacto. Para dilucidar los cambios en la morfología celular a consecuencia de la anisotropía superficial de la aleación, las células se incubaron durante 1 h sobre las muestras PL y G2 y se examinaron mediante MEB (Fig. 21). Las células cultivadas sobre las superficies PL se dispusieron aplanadas y expandidas y se observó la formación de lamelipodios en todas las direcciones, confiriendo a las células una forma redondeada. Sobre las superficies mecanizadas las células exhibieron mayor volumen y presentaron una forma más alargada con un gran número de prolongaciones digitiformes o filopodios anclados en las crestas de los surcos. Estas características fueron similares en ambos tipos celulares.

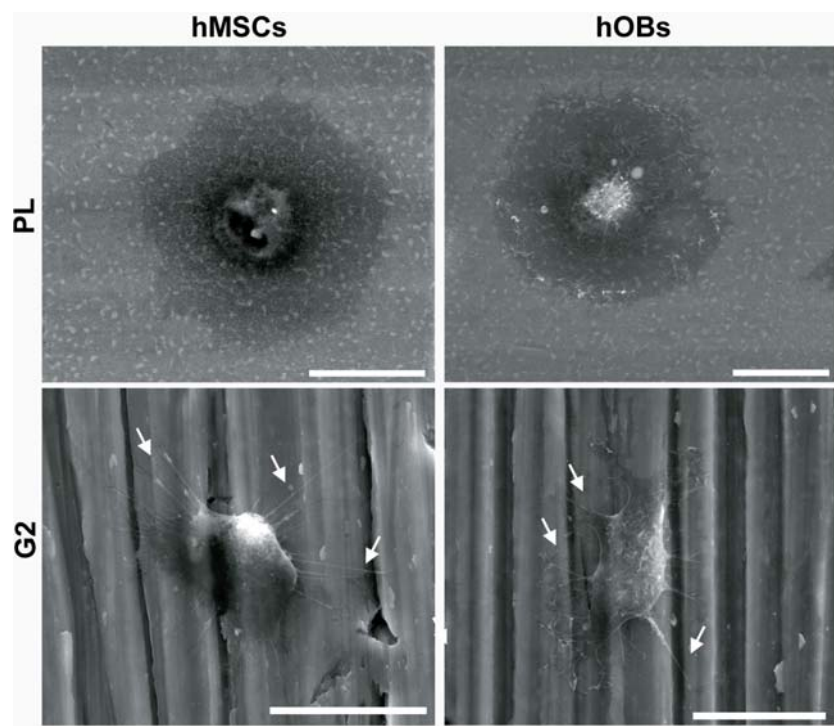


Figura 21. Formación de filopodios y lamelipodios sobre las superficies de Ti64 modificadas topográficamente. Imágenes obtenidas mediante MEB de células cultivadas durante 1 h sobre superficies PL y G2. Las extensiones citoplasmáticas se indican con flechas. Imágenes representativas de tres experimentos independientes con resultados similares. Barra = 20 μ m.

Ya que el ensamblaje de filamentos proteicos de actina y tubulina es responsable de la formación de filopodios y lamelipodios, a continuación quisimos estudiar la participación de estas estructuras del citoesqueleto en el proceso de orientación celular tras tiempos cortos de incubación, de 1 y 4 h (Figs. 22 y 23).

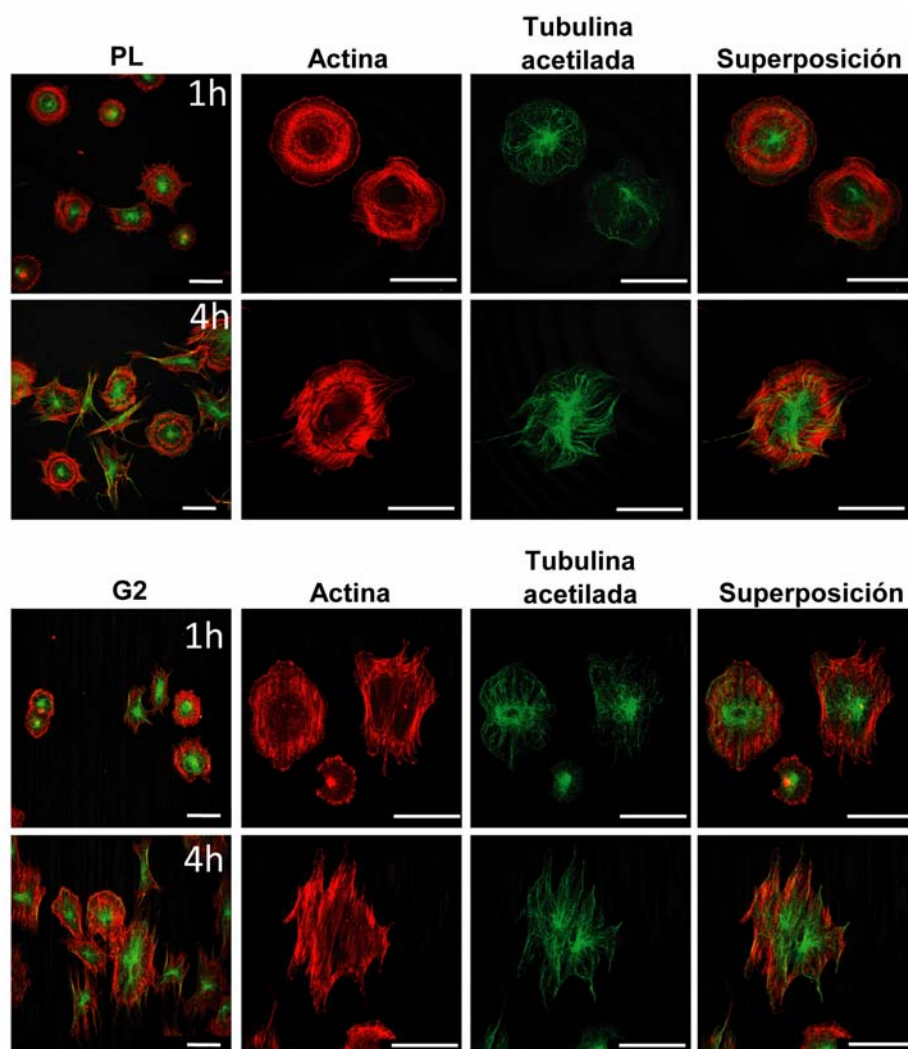


Figura 22. Reorganización del citoesqueleto de actina y tubulina en hMSCs cultivadas sobre las superficies de Ti64 modificadas topográficamente. Tinción de actina (rojo) y tubulina acetilada (verde) en hMSCs cultivadas durante 1 y 4 h sobre las superficies PL y G2. Imágenes representativas de tres experimentos independientes con resultados similares. La orientación de los surcos en las superficies G2 corresponde a 90° con la horizontal. Barra = 50 μ m.

Tras 1 h de incubación sobre las superficies pulidas las células presentaron forma esférica, la actina se organizó formando estructuras concéntricas y los microtúbulos estables, formados por tubulina acetilada, se dispusieron mayoritariamente en la zona perinuclear (Fig. 22 y 23). Al aumentar el tiempo de incubación hasta 4 h, las células adoptaron una morfología estrellada, observándose la formación en todas las direcciones de prolongaciones citoplasmáticas que contienen actina. Además, se detectó la presencia de haces de microtúbulos atravesando el citoplasma, desde la región perinuclear hacia las extensiones

citoplasmáticas. Sobre las superficies mecanizadas, se observó la formación de lamelipodios, que integran actina y tubulina acetilada, en la dirección de los surcos desde tiempos de incubación de 1 h (Figs. 22 y 23). No se observaron diferencias en la organización del citoesqueleto entre los dos tipos celulares en ninguna de las superficies estudiadas.

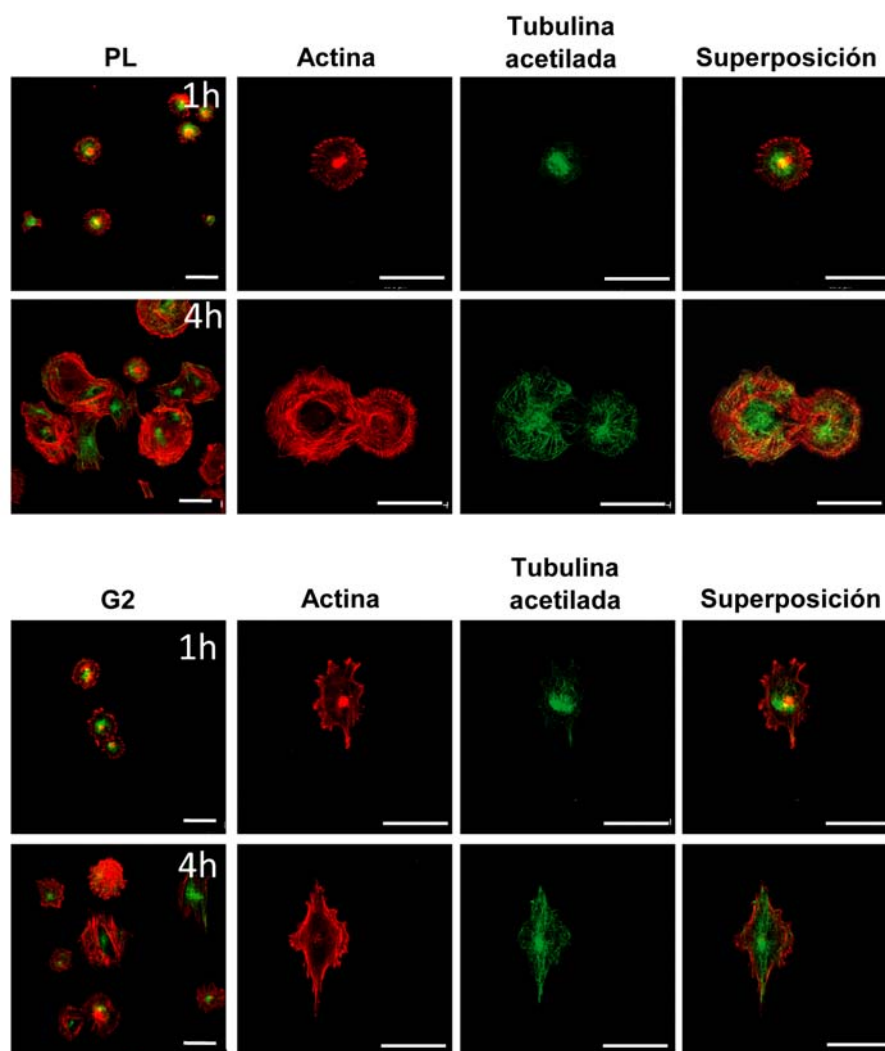


Figura 23. Reorganización del citoesqueleto de actina y tubulina en hOBs cultivados sobre las superficies de Ti64 modificadas topográficamente. Tinción de actina (rojo) y tubulina acetilada (verde) en hOBs cultivados durante 1 y 4 h sobre las superficies PL y G2. Imágenes representativas de tres experimentos independientes con resultados similares. La orientación de los surcos en las superficies G2 corresponde a 90° con la horizontal. Barra = 50 μ m.

3.3.2. Formación de contactos focales durante el proceso de orientación celular sobre topografías ordenadas de la aleación Ti64

Los contactos focales son grupos dinámicos de proteínas estructurales y funcionales que conectan el citoesqueleto de actina a la MEC, y proporcionan soporte estructural a las células. Dado que el proceso de mecanizado induce cambios en la organización del citoesqueleto y la FN, a continuación nos propusimos investigar el efecto de las topografías

ordenadas de la aleación sobre la distribución de los contactos focales. Para ello, se realizó un marcaje simultáneo de paxilina y actina en células cultivadas durante 4 h sobre las distintas superficies y se examinó su colocalización mediante microscopía confocal (Fig. 24).

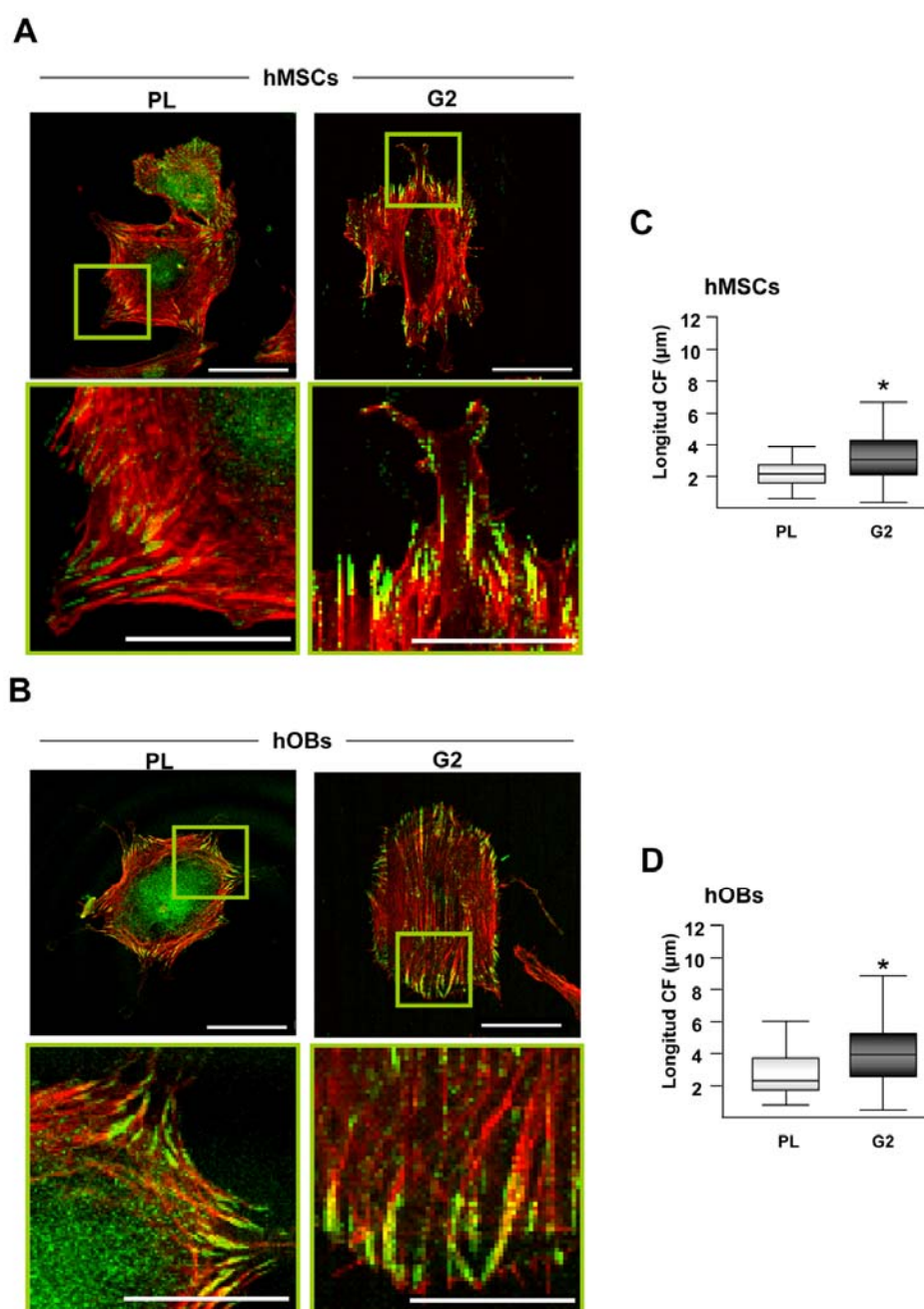


Figura 24. Distribución de contactos focales (CF) en células cultivadas sobre las superficies de Ti64 modificadas topográficamente. Tinción de actina (rojo) y paxilina (verde) en (A) hMSCs y (B) hOBs cultivados durante 4 h sobre las superficies PL y G2. Imágenes representativas de tres experimentos independientes con resultados similares. La orientación de los surcos en las superficies G2 corresponde a 90° con la horizontal. Barra = 50 μm . Los diagramas de cajas (C - D) muestran la media \pm DE de la longitud de 100 contactos seleccionados al azar en cada tipo de muestra. * $p < 0,05$ comparado con las muestras PL.

La paxilina es una proteína adaptadora presente en los contactos focales que posibilita el reclutamiento de otras moléculas de señalización implicados en la reorganización del citoesqueleto de actina. El examen microscópico de las células indicó que, en ambos tipos celulares, la paxilina se distribuye mayoritariamente en la periferia celular, colocalizando con los extremos de los filamentos de actina (Fig. 24 A-B). Sobre las superficies PL los contactos focales marcados con paxilina se dispusieron aleatoriamente en la periferia celular, mientras que sobre las superficies G2 mostraron una tendencia a orientarse en la dirección de los surcos y presentaron una longitud mayor (Fig. 24 C-D).

En conjunto, estos datos indican que la topografía ordenada de la aleación Ti64 modula la formación y disposición de proyecciones citoplasmáticas y la organización del citoesqueleto durante el proceso de adhesión celular. Además, estas superficies anisotrópicas regulan el tamaño de los contactos focales, que se distribuyen en la dirección de los surcos generados tras el proceso de mecanizado.

3.4. PARTICIPACIÓN DE LA VIA RHOA/ROCK EN LOS PROCESOS DE ALINEACION Y ELONGACIÓN CELULAR SOBRE LAS SOBRE TOPOGRAFÍAS ORDENADAS DE LA ALEACIÓN Ti64

La GTPasa Rho, y en particular su isoforma RhoA juega un papel crucial en el proceso de adhesión celular así como en el ensamblaje del citoesqueleto de actina, el establecimiento de la polaridad celular y la dinámica de los microtúbulos. En este apartado quisimos estudiar la implicación de RhoA y de uno de sus principales efectores, ROCK, en el proceso de orientación por contacto de las células hMSCs y hOBs sobre las superficies mecanizadas. Para ello, las células se cultivaron sobre las superficies PL y G2 en presencia o ausencia de agentes que atenúan la actividad de estas moléculas.

3.4.1. Actividad de RhoA y ROCK

En primer lugar se cuantificaron los niveles basales de actividad RhoA y ROCK en células hMSCs y hOBs cultivados sobre PE durante 2 y 24 h. Los resultados obtenidos indican que la actividad enzimática de RhoA fue superior en hMSCs que en hOBs y los niveles de actividad disminuyeron con el tiempo de incubación en ambos tipos celulares (Fig. 25 A). Como inhibidor de Rho se empleó la exoenzima transferasa C3, que ADP ribosila las tres isoformas de Rho de forma específica [Vogelsgesang y col. 2007]. El tratamiento con transferasa C3 durante 2 h disminuyó los niveles de actividad RhoA y este efecto fue más pronunciado tras 24 h de

incubación en ambos tipos celulares. A continuación, quisimos evaluar el efecto del tratamiento con transferasa C3 en la morfología de células cultivadas sobre la aleación Ti64. La atenuación de la actividad de RhoA en células cultivadas sobre superficies PL dio lugar a alteraciones en la organización de los filamentos de actina y a un incremento en el área celular (Fig. 25 B). Estos cambios en la morfología y en la reorganización del citoesqueleto de actina también se detectaron en células cultivadas en presencia de transferasa C3 sobre las superficies mecanizadas (Fig. 25 C).

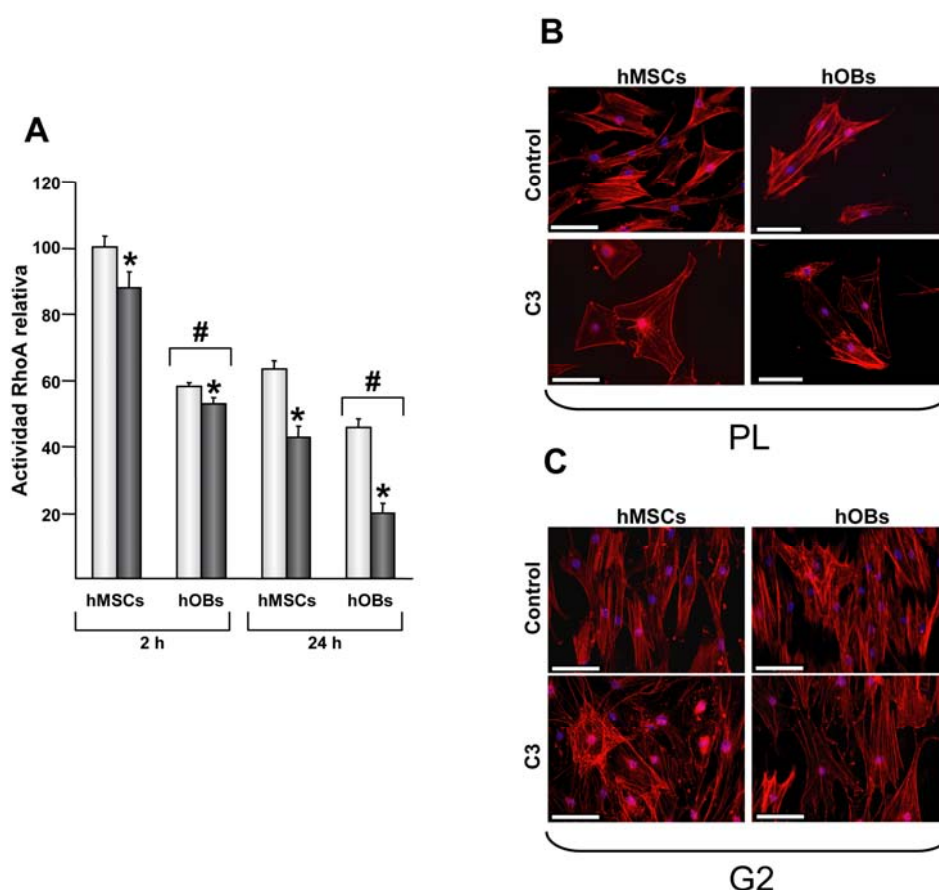


Figura 25. Efecto de la transferasa C3 en la actividad de la GTPasa RhoA. (A) Actividad de RhoA en células cultivadas durante 2 y 24 h sobre PE en ausencia (□) o presencia (■) de transferasa C3. Los resultados se expresaron como el porcentaje de la actividad cuantificada en hMSCs cultivadas durante 2 h y sin tratar, a la que se asignó un valor arbitrario de 100%. Cada valor representa la media \pm DE de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$ en comparación con las células sin tratar, # $p < 0,05$ en comparación con hMSCs. Tinción de actina (rojo) y núcleos (azul) en células cultivadas durante 24 h sobre las superficies PL (B) y G2 (C) en ausencia o presencia de transferasa C3. Imágenes representativas de tres experimentos independientes con resultados similares. La orientación de los surcos en las superficies G2 corresponde a 90° con la horizontal. Barra = 100 μ m.

De manera similar a lo observado para RhoA, la actividad ROCK detectada en células cultivadas sobre PE disminuyó a lo largo del tiempo de incubación (Fig. 26 A). Tras 2 h en cultivo la actividad quinasa de ROCK fue similar en ambos tipos celulares mientras que tras 24

h de incubación los niveles de actividad ROCK fueron mayores en hMSCs que en hOBs. Como inhibidor de ROCK se empleó HF, una molécula que se une específicamente a su dominio quinasa atenuando su actividad. Se detectó una disminución de entre un 30 y un 40% en los niveles de actividad ROCK en ambos tipos celulares tras 2 h de cultivo en presencia de HF. Sin embargo, tras 24 h de incubación los niveles de actividad ROCK fueron similares a los detectados en células sin tratar. Aunque la atenuación de la actividad de ROCK fue transitoria, probablemente debido a la corta vida media del HF [Liao y col. 2007], el tratamiento indujo cambios en la morfología de células cultivadas sobre las superficies metálicas. De manera similar a lo observado en células cultivadas en presencia de transferasa C3, el tratamiento con HF condujo a la desorganización del citoesqueleto de actina y a un aumento en el área de células cultivadas sobre superficies tanto pulidas como mecanizadas (Fig. 26 B-C).

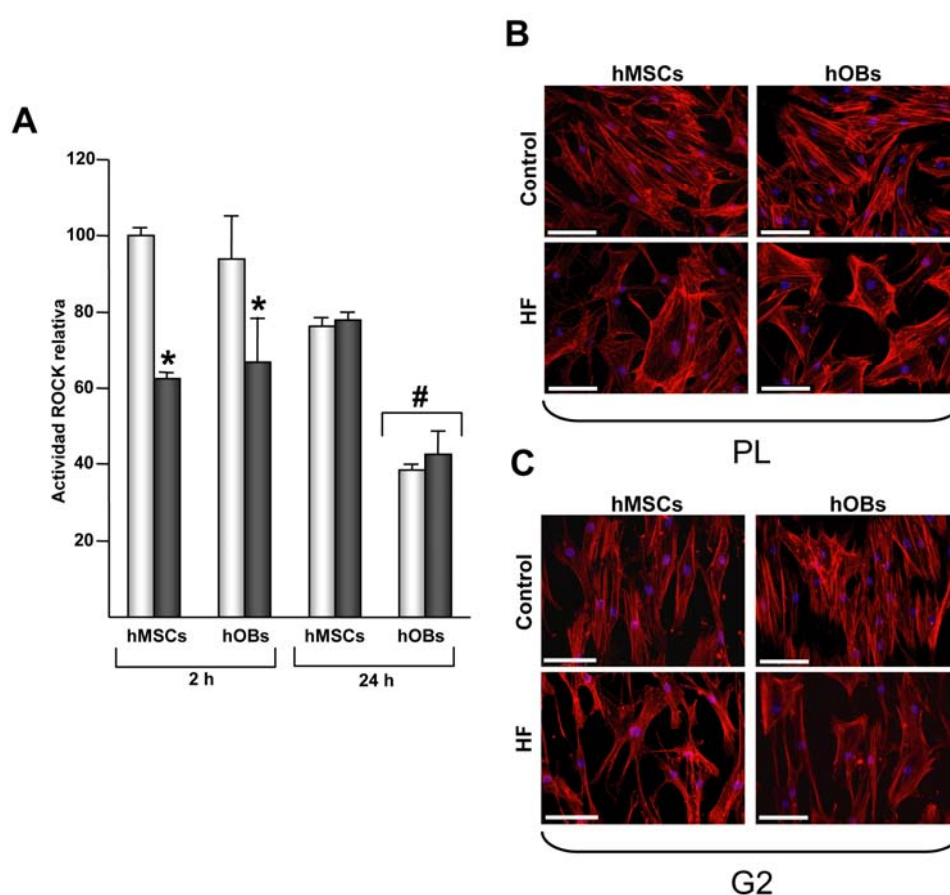


Figura 26. Efecto del hidroxifasudil (HF) en la actividad de ROCK. (A) Actividad ROCK en células cultivadas durante 2 y 24 h sobre PE en ausencia (□) o presencia (■) de HF. Los resultados se expresaron como el porcentaje de la actividad cuantificada en hMSCs cultivadas durante 2 h y sin tratar, a la que se asignó un valor arbitrario de 100%. Cada valor representa la media \pm DE de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$ en comparación con las células sin tratar, # $p < 0,05$ en comparación con hMSCs. Tinción de actina (rojo) y núcleos (azul) de células cultivadas durante 24 h sobre las superficies PL (B) y G2 (C) en ausencia o presencia de HF. Imágenes representativas de tres experimentos independientes con resultados similares. La orientación de los surcos en las superficies G2 corresponde a 90° con la horizontal. Barra = 100 μ m.

3.4.2. Efecto de la atenuación de la actividad de RhoA y ROCK en el proceso de orientación y elongación celular sobre topografías ordenadas de la aleación Ti64

Con el fin de investigar si la anisotropía superficial de la aleación Ti64 regula la actividad enzimática de RhoA, las células se incubaron durante 4 h sobre las superficies metálicas y se cuantificó la actividad de esta GTPasa. En comparación con las superficies pulidas, en ambos tipos celulares se detectó un incremento en la actividad RhoA tras cultivar las células sobre las muestras mecanizadas (Fig. 27).

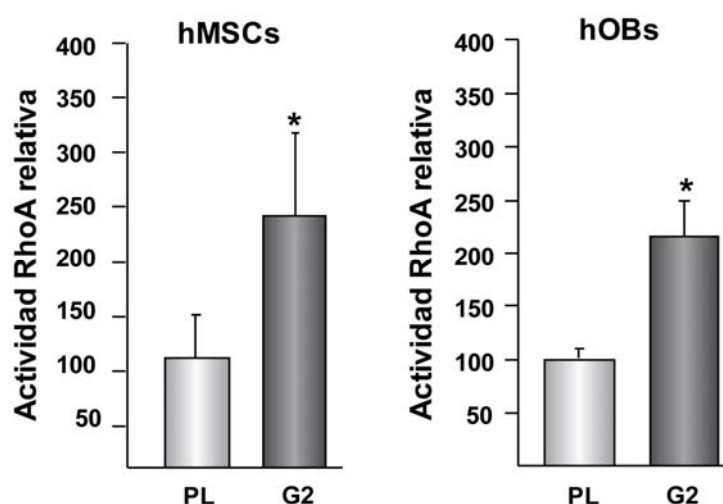


Figura 27. Actividad de la GTPasa RhoA en células cultivadas sobre topografías ordenadas de la aleación Ti64. Actividad RhoA en hMSCs y hOBs cultivadas durante 4 h sobre las superficies ensayadas. Los resultados se expresaron como el porcentaje de la actividad cuantificada en las células cultivadas sobre las superficies PL, a la que se asignó un valor arbitrario de 100%. Cada valor representa la media \pm DE de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$ en comparación con PL.

A continuación se investigó la localización de la GTPasa RhoA durante el proceso de orientación celular mediante microscopía confocal. Para ello, las células se incubaron durante 4 h sobre las superficies metálicas en ausencia o presencia de transferasa C3 (Fig. 28). Las imágenes obtenidas revelan que RhoA se localiza principalmente en la zona perinuclear y en las extensiones citoplasmáticas de células sin tratar cultivadas sobre superficies PL (Fig. 28 A). Sobre las superficies G2 se observó una acumulación de RhoA en las prolongaciones citoplasmáticas así como en zonas de la superficie celular que están en contacto con las crestas de los surcos (Fig. 28 A). Este patrón de distribución de RhoA se observó tanto en hMSCs como en hOBs. En ambos tipos celulares, el tratamiento con C3 condujo a una pérdida casi total de la localización de RhoA en las extensiones celulares, detectándose acumulación de la GTPasa en el citoplasma celular (Fig. 28 B).

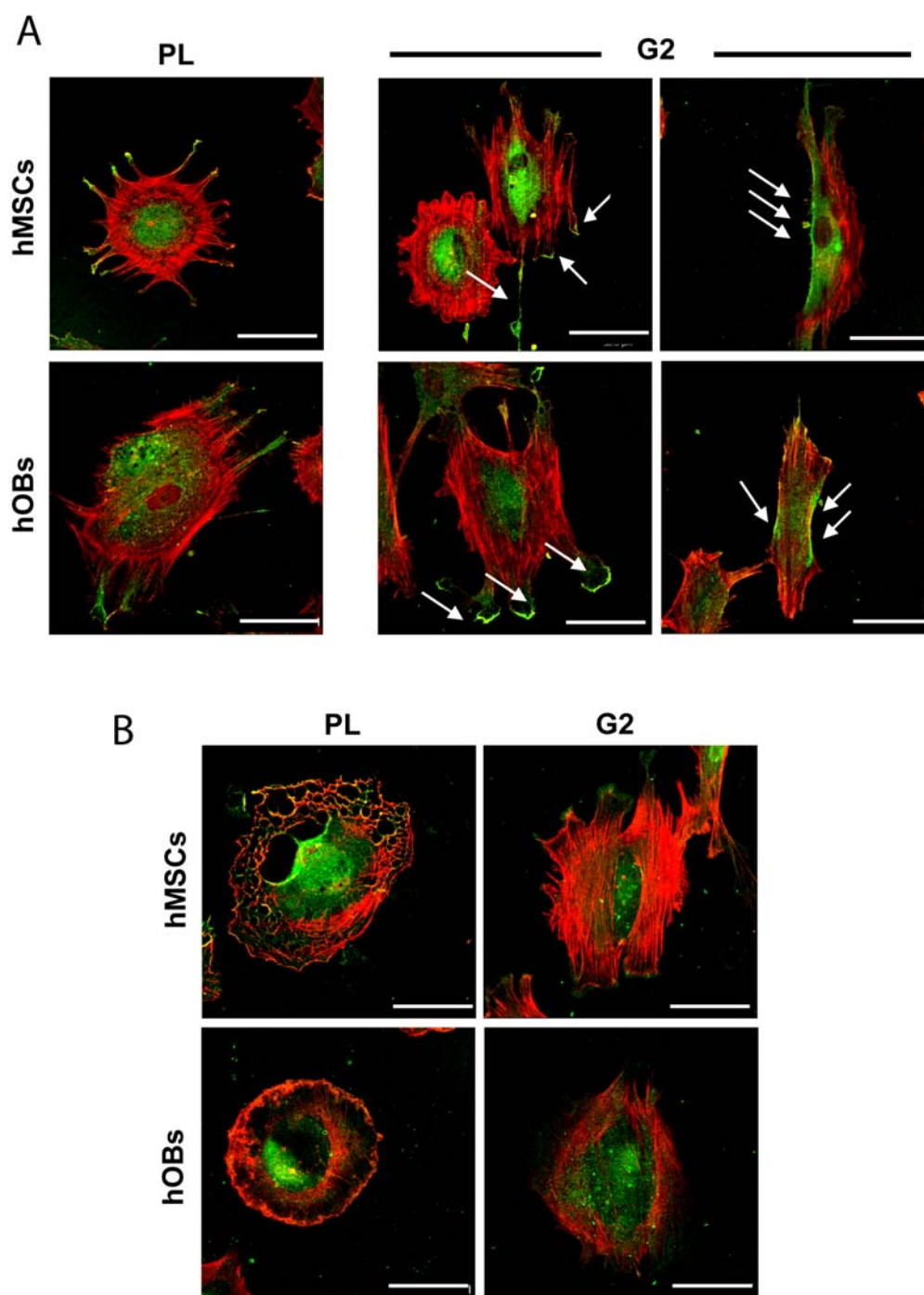


Figura 28. Localización de la GTPasa RhoA en células cultivadas sobre topografías ordenadas de la aleación Ti64. Tinción de actina (rojo) y RhoA (verde) en hMSCs y hOBs cultivados durante 4 h sobre las superficies PL y G2 en ausencia (A) o presencia (B) de transferasa C3. Las flechas indican zonas donde se acumula RhoA. Imágenes representativas de tres experimentos independientes con resultados similares. La orientación de los surcos en las superficies G2 corresponde a 90° con la horizontal. Barra = 50 μm.

De forma similar a lo observado para la proteína RhoA, la actividad de ROCK en hMSCs aumentó sobre las muestras G2 en comparación con las superficies PL (Fig. 29). Sin embargo, la actividad de ROCK detectada en hOBs fue similar sobre ambas superficies.

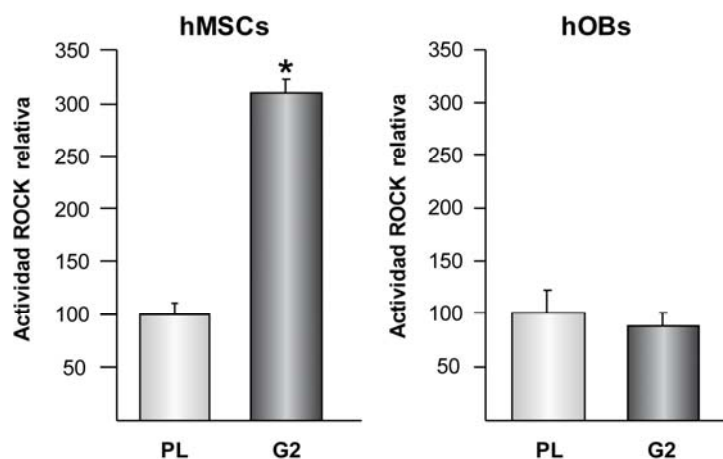


Figura 29. Actividad de ROCK en células cultivadas sobre topografías ordenadas de la aleación Ti64. Actividad ROCK en hMSCs y hOBs cultivadas durante 4 h sobre las superficies ensayadas. Los resultados se expresaron como el porcentaje de la actividad cuantificada en las células cultivadas sobre las superficies PL, a la que se asignó un valor arbitrario de 100%. Cada valor representa la media \pm DE de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$ en comparación con PL.

Posteriormente se evaluó el efecto de la atenuación de la actividad de RhoA en la orientación celular sobre superficies mecanizadas. Se investigó si la interferencia en la actividad de esta GTPasa afecta tanto a la orientación de las células en el momento de la siembra, como a la de células ya orientadas sobre las superficies mecanizadas. Para ello se ensayaron dos condiciones experimentales: en la primera la transferasa C3 se añadió en el momento de la siembra, mientras que en la segunda condición se añadió al medio de cultivo 24 h después de la siembra. En ambos casos se realizó una incubación de 24 h tras añadir la transferasa C3. Las gráficas mostradas en la figura 30 revelan que en ambas condiciones experimentales la atenuación de la actividad de RhoA provocó una notable disminución ($p < 0,05$) en la orientación de células hMSCs sobre las superficies G2, pero no en la de hOBs. No se encontraron diferencias significativas en la disminución de la orientación de hMSCs tratadas con transferasa C3 en el momento de la siembra o 24 h después ($p > 0,05$).

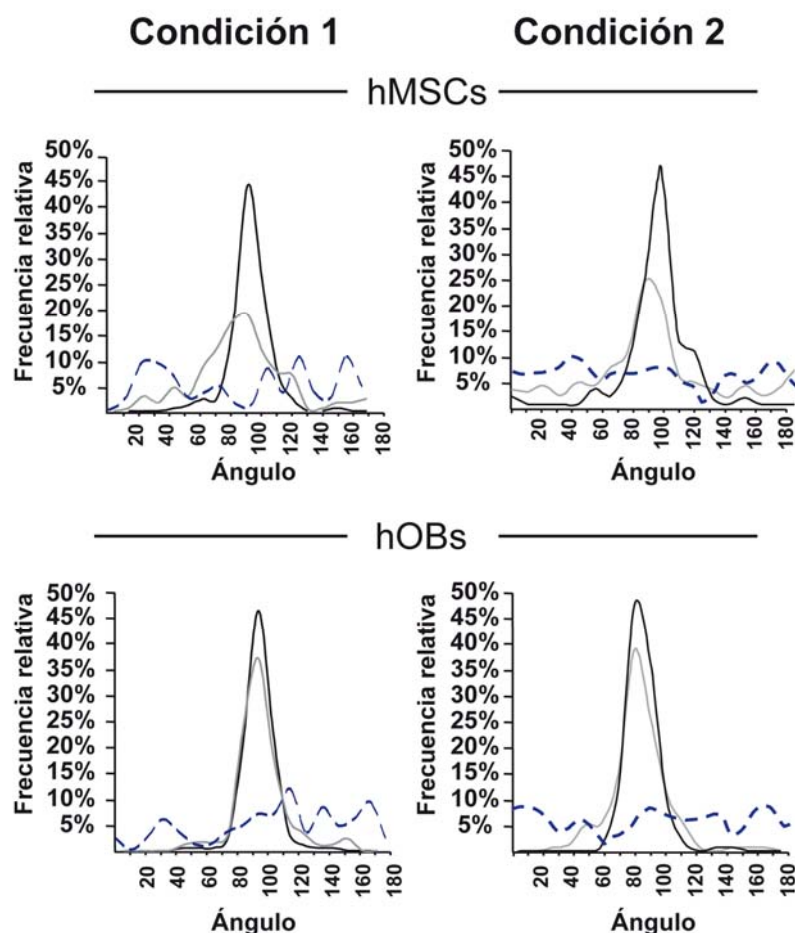


Figura 30. Participación de la GTPasa RhoA en la orientación celular sobre las superficies de Ti64 modificadas topográficamente. Los histogramas de frecuencias relativas muestran la orientación celular sobre las superficies G2. Las células se cultivaron sobre las superficies ensayadas en ausencia (negro) o presencia de transferasa C3 (gris) en dos condiciones experimentales distintas. Condición 1: la transferasa C3 se añadió en el momento de la siembra; Condición 2: la transferasa C3 se añadió 24 h después de la siembra. En ambas condiciones experimentales las células se cultivaron durante 24 h en presencia o ausencia de transferasa C3. Como control se muestra la orientación de células no tratadas con transferasa C3 y cultivadas sobre superficies PL (línea discontinua). La orientación de los surcos en las superficies G2 corresponde a 90° con la horizontal.

A continuación se investigó si la atenuación de la actividad de ROCK afectaba a la orientación de células hMSCs y hOB, empleando las dos condiciones experimentales descritas anteriormente (Fig. 31). De forma similar a lo observado para RhoA, la atenuación de la actividad de ROCK no afectó la orientación de hOBs sobre superficies G2, en ninguna de las condiciones experimentales ensayadas. Por el contrario, el tratamiento con HF en el momento de la siembra condujo a una disminución ($p < 0,05$) en la orientación de células hMSCs mientras que no se observó ningún efecto cuando las células se trataron tras 24 h de cultivo (Fig. 31).

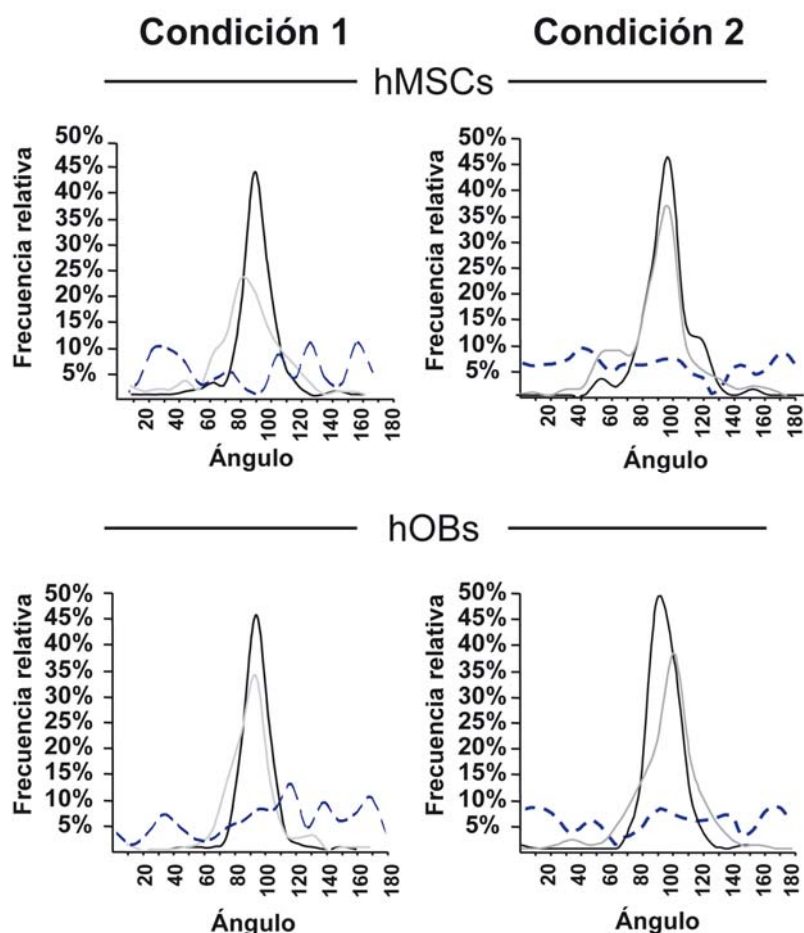


Figura 31. Participación de ROCK en la orientación celular sobre las superficies de Ti64 modificadas topográficamente. Los histogramas de frecuencias relativas muestran la orientación celular sobre las superficies G2. Las células se cultivaron sobre las superficies ensayadas en ausencia (negro) o presencia de HF (gris) en dos condiciones experimentales distintas. Condición 1: el HF se añadió en el momento de la siembra; Condición 2: el HF se añadió 24 h después de sembrar las células sobre las muestras. En ambas condiciones experimentales las células se cultivaron durante 24 h en presencia o ausencia de HF. Como control se muestra la orientación de células no tratadas con inhibidor y cultivadas sobre superficies PL (línea discontinua). La orientación de los surcos en las superficies G2 corresponde a 90° con la horizontal.

Por último se analizó la elongación de las células cultivadas sobre las superficies mecanizadas y tratadas con transferasa C3 o HF añadidos en el momento de la siembra (Fig. 32). En comparación con las células sin tratar, la elongación celular se redujo significativamente ($p < 0,05$) en las superficies mecanizadas tras la atenuación de la actividad de RhoA (Fig. 32 A), mientras que no se vio afectada tras disminuir la actividad de ROCK (Fig. 32 B).

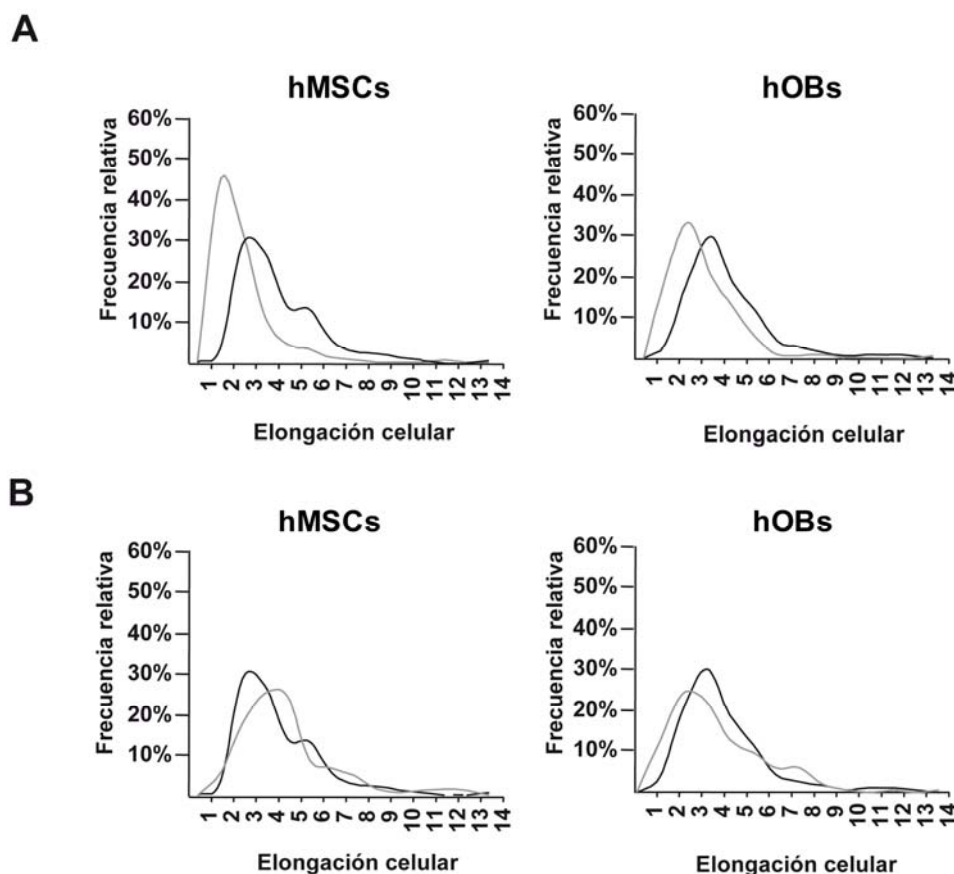


Figura 32. Implicación de la GTPasa RhoA y su efector ROCK en la elongación celular sobre las superficies de Ti64 modificadas topográficamente. Los histogramas de frecuencias relativas muestran la distribución de la elongación celular sobre las superficies G2. Las células fueron sembradas en ausencia (negro) o presencia de transferasa C3 (A) o HF (B) (gris) y cultivadas durante 24 h sobre las muestras mecanizadas.

3.4.3. Efecto de la atenuación de la actividad de RhoA y ROCK en la organización del citoesqueleto de α -acetil-tubulina en células cultivadas sobre topografías ordenadas de la aleación Ti64

Dado que la reorganización del citoesqueleto de tubulina está implicada en el control de la elongación celular, decidimos investigar el efecto de la interferencia de la actividad de RhoA y ROCK en la disposición de los microtúbulos estables. Para ello se sembraron las células durante 4 h sobre los materiales, en presencia o ausencia de transferasa C3 o HF y se observó la organización de la tubulina acetilada. Las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal muestran que en ambos tipos celulares el tratamiento con HF no afectó a la reorganización de la tubulina acetilada, que se dispuso formando una red de filamentos interconectados desde la región perinuclear hacia el citoplasma, de un modo similar al observado en células sin tratar (Fig. 33). Esta red adoptó una morfología circular o estrellada

sobre las superficies pulidas, mientras que sobre las superficies mecanizadas presentaron una disposición polarizada, siguiendo la topografía del sustrato. Por el contrario, las células tratadas con transferasa C3 exhibieron un citoesqueleto de tubulina acetilada altamente desorganizado, detectándose una elevada concentración de la molécula en la zona perinuclear y escasos filamentos en la periferia celular.

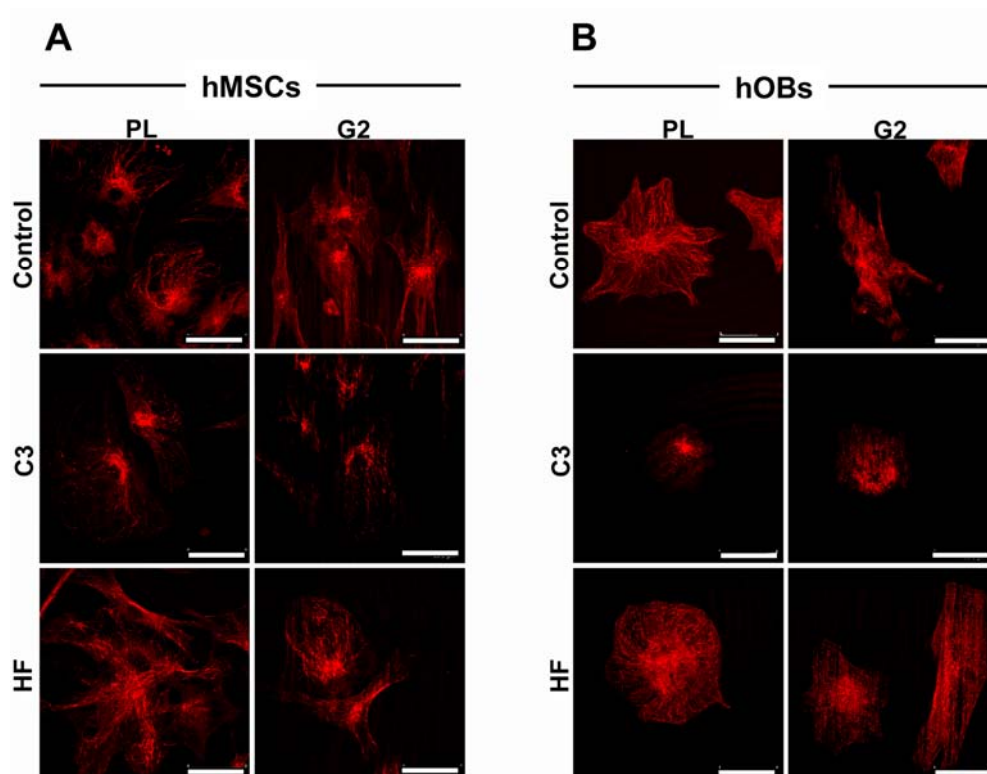


Figura 33. Efecto de la atenuación de la actividad de RhoA y ROCK en la organización del citoesqueleto de α -acetil-tubulina en células cultivadas sobre las superficies de Ti64 mecanizadas. Tinción de tubulina acetilada (rojo) en células cultivadas durante 4 h sobre las superficies PL y G2. Imágenes representativas de tres experimentos independientes con resultados similares. La orientación de los surcos en las superficies G2 corresponde a 90° con la horizontal. Barra = 50 μ m.

Tomados en conjunto, estos datos indican que la GTPasa RhoA participa en el proceso de orientación por contacto sobre las superficies mecanizadas a través de su efector ROCK en células hMSCs.

3.5. EFECTO DE LA TOPOGRAFÍA ORDENADA DE LA ALEACIÓN Ti64 SOBRE LOS PROCESOS DE PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN CELULAR

Se ha observado que la morfología que adoptan las células sobre el sustrato influye notablemente en el proceso de proliferación y determina la diferenciación de células precursoras hacia distintos linajes [Kilian y col. 2010]. En este apartado quisimos investigar la

influencia de la anisotropía superficial de las muestras mecanizadas en la proliferación celular, así como en la diferenciación de células hMSCs hacia los linajes osteogénico y adipogénico.

3.5.1. Efecto de la topografía ordenada de la aleación Ti64 sobre la proliferación celular

Después de adherirse al implante, las células comienzan un periodo de proliferación y colonización del implante. Los datos mostrados en la figura 34 indican que la proliferación celular aumentó con el tiempo en los materiales ensayados, independientemente del tipo celular examinado. Se observó un incremento en la proliferación de células hMSCs sobre las superficies mecanizadas, en comparación con las muestras PL al cabo de 7 días. Por el contrario, los cambios en la topografía de la aleación Ti64 no afectaron a la proliferación de los hOBs.

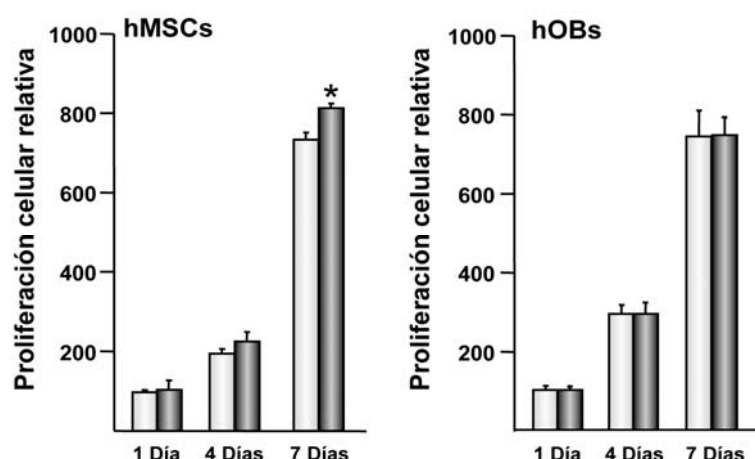


Figura 34. Proliferación celular sobre las superficies de Ti64 modificadas topográficamente. Las células se cultivaron durante 1, 4 y 7 días sobre las superficies PL (□) y G2 (■). Los resultados obtenidos se expresan como el porcentaje de fluorescencia medido sobre las muestras PL después de 1 día de cultivo, a la que se asignó un valor arbitrario de 100%. Cada valor representa la media ± DE de cuatro experimentos independientes, con resultados similares. * $p < 0,015$ comparado con las muestras PL, dentro del mismo tiempo.

3.5.2. Efecto de la topografía ordenada de la aleación Ti64 sobre la diferenciación de células hMSCs

Habiendo observado que las superficies mecanizadas incrementan la proliferación de células hMSCs, nos planteamos si serían capaces de promover la maduración de osteoprogenitores, lo que aseguraría un buen anclaje entre el hueso y el implante. En este apartado quisimos evaluar el efecto del mecanizado de la aleación sobre la capacidad de diferenciación de hMSCs a linaje osteoblástico. Para ello, las células se incubaron en presencia de un medio inductor de osteogénesis durante 12 días y se cuantificaron la actividad FA y la

secreción de OPN sobre los distintos materiales. En comparación con superficies pulidas, se observó un incremento en la actividad FA así como en la secreción de OPN tras cultivar las células sobre las superficies mecanizadas (Fig. 35).

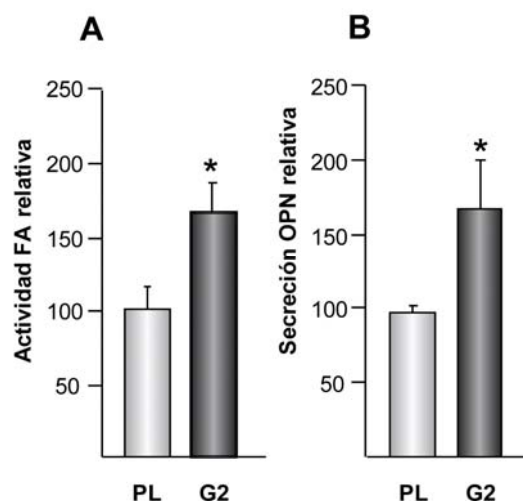


Figura 35. Diferenciación osteoblástica sobre las superficies de Ti64 modificadas topográficamente. Las células se cultivaron durante 12 días en presencia de medio osteogénico sobre las superficies ensayadas y se determinó (A) la actividad fosfatasa alcalina (FA) y (B) la secreción de osteopontina (OPN) al medio extracelular. Los resultados obtenidos se expresan como el porcentaje de absorbancia medida sobre las muestras PL, a la que se asignó un valor arbitrario de 100%. Cada valor representa la media \pm DE de cuatro experimentos independientes, con resultados similares. * $p < 0,015$ comparado con las muestras PL.

A continuación quisimos evaluar el efecto del mecanizado de la aleación sobre la capacidad de diferenciación de hMSCs a linaje adipogénico (Fig. 36). Para ello, las células se incubaron en presencia de medio adipogénico y se cuantificó la formación de vacuolas lipídicas mediante el empleo del reactivo “Oil Red O”.

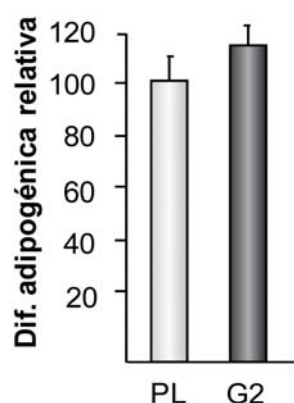


Figura 36. Diferenciación adipogénica sobre las superficies de Ti64 modificadas topográficamente. Las células se cultivaron durante 15 días en presencia de medio adipogénico sobre las superficies y se cuantificó la formación de vacuolas lipídicas. Los resultados obtenidos se expresan como el porcentaje de absorbancia medido sobre las muestras PL, a la que se asignó un valor arbitrario de 100%. Cada valor representa la media \pm DE de cuatro experimentos independientes, con resultados similares.

Los datos obtenidos revelaron que las superficies mecanizadas promueven la diferenciación adipogénica a un nivel similar al detectado sobre las muestras pulidas (Fig. 36).

En conjunto, nuestros resultados indican que el proceso de mecanizado en la aleación Ti64 conduce a un incremento en la proliferación y la diferenciación de hMSCs hacia el linaje osteoblástico mientras que no afecta al proceso de diferenciación hacia el linaje adipogénico.

DISCUSIÓN

En las últimas décadas se han explorado modificaciones en la superficie de biomateriales metálicos convencionales con el fin de mejorar su rendimiento en función de la aplicación para la que han sido diseñados. La respuesta celular a estas superficies modificadas estará condicionada por los cambios en sus propiedades químicas, físicas y topográficas [Boyan y col. 1996, Anselme y col. 2010]. En el presente trabajo se han estudiado las interacciones entre células osteoformadoras o precursores mesenquimales y distintas modificaciones superficiales en materiales susceptibles de ser empleados en la fabricación de implantes ortopédicos. Entre los criterios aceptados por la comunidad científica para identificar células MSC se ha establecido que han de ser adherentes en cultivo, expresar marcadores típicos de células de origen mesodérmico en ausencia de marcadores hematopoyéticos y del sistema inmune y ser capaces de diferenciarse *in vitro* a osteoblastos, adipocitos y condroblastos [Dominici y col. 2006]. Las células hMSCs empleadas en este trabajo cumplen con los criterios mínimos que las definen: son células adherentes con morfología fibroblastoide, expresan los marcadores de superficie CD44, CD29 y CD105, en ausencia de los antígenos hematopoyéticos CD34 y CD45 y del sistema inmune CD14 y son capaces de diferenciarse a los linajes osteogénico y adipogénico. Además, las células hMSCs expresan los factores de transcripción Oct-4 y Sox-2, implicados en el mantenimiento de la pluripotencialidad celular [Takahashi y Yamanaka, 2006]. Por el contrario, la ausencia de estos factores en hOBs revela que estas células poseen características de células maduras. La capacidad de mineralización y secreción de OC confirma que los hOBs son células del linaje osteoblástico. En este sentido, estudios *in vivo* revelan que células obtenidas a partir de explantes óseos trasplantadas en ratones desnudos promueven una mayor formación de hueso ectópico que el inducido por células hMSCs [Yoshii y col. 2010]. La presencia de estructuras de OC en forma de anillo hexagonal localizadas en la matriz extracelular de los hOBs podría estar asociada a la formación de cristales de fosfato cálcico, similares a los que conforman la hidroxiapatita del hueso [Flade y col. 2001]. Tomados en conjunto, estos datos indican que las células hMSCs empleadas en el presente trabajo se encuentran en un estado indiferenciado y poseen capacidad osteogénica, mientras que las obtenidas a partir de explantes óseos son células osteoformadoras.

1. EFECTO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA SUPERFICIAL DE RECUBRIMIENTOS BASADOS EN CARBONO TIPO DIAMANTE SOBRE LA RESPUESTA CELULAR

La posibilidad de controlar el comportamiento de células implicadas en la formación y regeneración ósea sobre biomateriales con aplicación en cirugía ortopédica mediante modificaciones en su superficie ha ganado atención en los últimos años. Los recubrimientos

híbridos DLC-PTFE-h y DLC-PDMS-h poseen una composición química homogénea y combinan las propiedades antiadherentes de los polímeros con la elevada dureza del DLC [Anttila y col. 2003]. Estudios realizados empleando distintos tipos celulares como macrófagos, fibroblastos y osteoblastos indican que los recubrimientos de DLC puros presentan una excelente biocompatibilidad *in vitro* [Singh y col. 2003, Chai y col. 2008, Roy y col. 2008]. Mientras que la respuesta celular al DLC ha sido ampliamente investigada, la información acerca de la biocompatibilidad de los recubrimientos DLC-PTFE-h y DLC-PDMS-h es muy escasa. Datos existentes en la literatura indican que los polímeros PTFE y PDMS son tolerados por el organismo y no causan toxicidad [Chen y col. 2003, Leclerc y col. 2003, Klenkler y col. 2005, Ito y col. 2010]. Cabe esperar que las modificaciones en las propiedades superficiales del DLC tras su combinación con estos polímeros permitan modular la respuesta celular al material. En el presente trabajo se ha estudiado el efecto de los recubrimientos híbridos DLC-PDMS-h y DLC-PTFE-h generados mediante FPAD sobre el comportamiento de células precursoras con capacidad osteogénica y células con fenotipo osteoblástico.

Los cambios en la composición química de un material modulan su mojabilidad, ya que los grupos químicos que presenta en su superficie son responsables de las interacciones moleculares que establece con el líquido en cuestión, generalmente agua. La mojabilidad de los recubrimientos DLC y DLC-h se determinó usando dos parámetros diferentes, el ángulo de contacto y el ángulo de deslizamiento del agua. Datos disponibles en la literatura indican que la mojabilidad de la superficie del material puede influir en la respuesta celular. La mayoría de estos trabajos se basan en la generación de monocapas autoensambladas (SAMs) con distintos grados de mojabilidad. Faucheux y col. (2004) observaron que la capacidad de adhesión y el área celular de fibroblastos humanos incrementó sobre SAMs con mojabilidad moderada ($48^\circ < \theta_w < 80^\circ$) en comparación con superficies hidrofóbicas ($\theta_w > 80^\circ$). Por el contrario, la proliferación de células osteoblásticas de ratón MC3T3-E1 sobre SAMs aumentó al incrementar la hidrofobicidad de la superficie [Kennedy y col. 2006]. Estas diferencias sugieren que el efecto de la mojabilidad superficial sobre el comportamiento celular depende en gran medida de los tipos celulares estudiados y de los parámetros evaluados. Nuestros resultados indican que los recubrimientos de DLC y DLC-PTFE-h promueven una adhesión similar tanto en células hMSCs como en hOBs, a pesar de poseer composiciones químicas y valores de los ángulos de contacto y deslizamiento diferentes. En concordancia con nuestros datos, la adhesión de estos tipos celulares fue similar sobre superficies de Ti64 hidrófobas ($\theta_w = 88^\circ$) e hidrófilas ($\theta_w = 9^\circ$), modificadas mediante irradiación con UV [Gallardo-Moreno y col. 2009]. Estos datos apuntan a que el efecto de la mojabilidad sobre la capacidad de adhesión de

células implicadas en el proceso de formación ósea puede estar modulado por otros parámetros, como la composición química del sustrato.

Los datos incluidos en la presente memoria revelan que valores altos de ángulo de contacto no siempre se correlacionan con bajos ángulos de deslizamiento. Hasta la fecha no existe ninguna teoría que pueda explicar esta relación aparentemente contradictoria. Los recubrimientos híbridos de DLC presentan una hidrofobicidad muy similar en términos de ángulo de contacto, si bien sus ángulos de deslizamiento son distintos. Ya que la facilidad con la que el agua se desplaza sobre las superficies de DLC-PDMS-h y DLC-PTFE-h es muy diferente, cabe esperar que el comportamiento celular sobre estas superficies varíe en función de este parámetro. En efecto, los recubrimientos de DLC-PTFE-h y DLC, con elevado ángulo de deslizamiento promueven una excelente adhesión y proliferación de hMSCs y hOBs mientras que las películas de DLC-PDMS-h, con ángulos de deslizamiento $<1^\circ$ alteran profundamente todas las funciones celulares examinadas. Pocos autores han estudiado la influencia del ángulo de deslizamiento de la superficie de un biomaterial sobre el comportamiento celular. Ino y col. (2007) observaron que materiales con propiedades ultra-repelentes al agua impiden la adhesión de células embrionarias de ratón, lo que probablemente sea debido a la incorrecta adsorción de proteínas a su superficie. En este sentido, se ha detectado mediante ensayos de adsorción competitiva que la mojabilidad de superficies de hexametildisiloxano modula la adsorción de albúmina y FN y condiciona la posterior respuesta celular al material. En concreto, se detectó que la albúmina se adsorbe preferentemente sobre superficies hidrofóbicas mientras que las superficies hidrofílicas favorecen una adsorción superior de fibronectina y promueven la adhesión inicial de células osteoblásticas [Wei y col. 2009]. Recientemente, Di Mundo y col. (2011) han observado variaciones en la respuesta de células osteoblásticas en función del valor del ángulo de deslizamiento, empleando como sustratos superficies de poliestireno modificadas por plasma de CF_4 . Sustratos con ángulos de deslizamiento superiores a 90° , que no repelen el agua, favorecieron la adhesión de células osteoblásticas en comparación con superficies súper-hidrofóbicas con valores del ángulo de deslizamiento en torno a 0° . Asimismo, se ha observado que células fibroblásticas de ratón incubadas sobre superficies que presentan zonas súper-hidrofóbicas y súper-hidrofílicas se adhieren de un modo muy selectivo a las regiones súper-hidrofílicas [Ishizaki y col. 2010]. Por otra parte, se ha visto que la motilidad de fibroblastos murinos sobre superficies hidrofóbicas es mayor que sobre sustratos hidrofílicos y que la tasa de migración celular aumenta notablemente sobre superficies con bajos valores de ángulo de deslizamiento [Su y col. 2007, Hsu y col. 2007]. Este efecto podría ser debido a la dificultad que encuentran las células para adherirse firmemente a sustratos que repelen el agua. Nuestros resultados indican que las

células hMSCs y hOBs incubadas sobre los recubrimientos de DLC-PDMS-h adoptan una morfología contraída y presentan un gran número de lamelipodios con filopodios en sus extremos. Una vez más, estas observaciones apuntan a que las células no pueden mantenerse adheridas a estas superficies ultra-repelentes.

Las escasas células adheridas a los recubrimientos de DLC-PDMS-h presentan daño celular y pérdida de la integridad de su membrana. Curiosamente, en algunos casos la tinción positiva para IP aparece asociada a marcaje positivo de calceína. Esta doble tinción positiva IP/calceína podría ser debida a que las células son capaces de procesar calceína-AM tras su muerte a través de su actividad esterasa residual, tal y como se ha descrito en células procariotas TK102 [Hiraoka y col. 2002]. Por otro lado, las células adheridas a superficies de DLC-PDMS-h exhiben una morfología contraída con vesículas en su membrana y presentan signos de condensación y fragmentación nuclear, rasgos morfológicos que sugieren que las células están en proceso de muerte celular [Leverrier y Ridley 2001]. En efecto, las células cultivadas sobre DLC-PDMS-h expresan la forma activa de la caspasa-3, principal ejecutor de la apoptosis en células somáticas [Thornberry y Lazebnik 1998, Porter y Jänicke 1999]. Además, el medio de cultivo recolectado tras la incubación en presencia de DLC-PDMS-h contiene agregados multicelulares formados por células no adheridas y apoptóticas, probablemente debido a un proceso de anoikis, una forma de muerte celular programada inducida por la pérdida de adhesión celular [Chiarugi y Gianonni 2008]. Diferentes autores han descrito en células tubulares y epiteliales de colon que las interacciones intercelulares son capaces en cierta medida de compensar la pérdida de señales de supervivencia mediadas por las interacciones célula-matriz [Bergin y col. 2000, Hoffman y col. 2007]. Sin embargo, la tinción de la forma activa de caspasa-3 detectada en los agregados de células hMSCs o hOBs no adheridas a DLC-PDMS-h indica que este mecanismo de supervivencia no es suficiente para mantener las células viables en suspensión.

Tomados en conjunto, nuestros resultados indican que los recubrimientos de DLC-PTFE-h permiten una correcta adhesión de células con capacidad osteoformadora y precursores mesenquimales a su superficie y podrían facilitar el crecimiento óseo en la interfaz hueso-implante. Su buena biocompatibilidad y propiedades antibacterianas hacen que los recubrimientos de DLC-PTFE-h sean candidatos prometedores para su aplicación en las zonas del implante que requieren una rápida osteointegración [Kinnari y col. 2008, Soininen y col. 2011]. Cabe especular que el desarrollo de recubrimientos rugosos con esta misma composición generaría un material con un mayor grado de funcionalidad que el conseguido empleando superficies pulidas. Por otra parte, los recubrimientos de DLC-PDMS-h poseen elevada resistencia al desgaste y a la corrosión y dificultan en gran medida la adhesión de

osteoblastos y precursores mesenquimales, lo cual probablemente sea debido al bajo ángulo de deslizamiento de su superficie [Ishizaki y col. 2010]. Todas estas propiedades serían muy ventajosas para el desarrollo de superficies articulantes, en las cuales el crecimiento celular podría originar artrofibrosis perjudicando su función, y que a su vez requieren un buen comportamiento frente al desgaste y la corrosión. Asimismo, los recubrimientos de DLC-PDMS-h podrían resultar de gran utilidad en la fabricación de dispositivos temporales que han de ser retirados tras el proceso de consolidación.

2. EFECTO DE LA TOPOGRAFÍA ORDENADA DE LA ALEACIÓN Ti64 SOBRE LA RESPUESTA CELULAR

Datos existentes en la literatura indican que las células cultivadas sobre superficies con topografías ordenadas se orientan y elongan en la dirección de la geometría del sustrato y que su grado de orientación depende de las dimensiones de la topografía [Curtis y Wilkinson 1997, Walboomers y col. 1998, Texeira y col. 2003, Lenhert y col. 2005, Loesberg y col. 2007, Charest y col. 2007, Crouch y col. 2009]. En el presente trabajo se ha investigado el comportamiento de células osteoblásticas y precursores mesenquimales sobre las superficies ordenadas de la aleación G1 y G2, con rugosidades promedio en los rangos nanométrico (< 100 nm) y submicrométrico (100-500 nm), respectivamente [Puckett y col. 2008]. Cabe destacar que el proceso de abrasión mecánica empleado para la generación de superficies anisotrópicas no altera la química superficial por lo que los efectos observados en la respuesta celular se deben atribuir únicamente a modificaciones en la topografía. Nuestros resultados indican que ambas superficies promueven la alineación en la dirección de los surcos de ambos tipos celulares. Diversos autores han señalado que la distribución no uniforme de proteínas de la MEC sobre la superficie del material puede influir notablemente en la orientación celular [den Braver y col. 1998, Recum y Van Kooten 2005]. Durante el proceso de adhesión celular a un biomaterial, las proteínas de la MEC interaccionan con su superficie mediante enlaces no covalentes. Así, cabe especular que la distribución desigual de cargas superficiales en la superficie de la aleación como consecuencia de la formación de surcos pueda modular la disposición ordenada de proteínas de la MEC y por lo tanto condicionar la disposición celular [Física, Tipler 1978]. Se ha detectado que el número de células orientadas sobre las superficies submicrométricas, con surcos de $1\text{ }\mu\text{m}$ de profundidad y $10\text{ }\mu\text{m}$ de ancho aumenta aproximadamente en un 30% con respecto a lo observado sobre superficies nanométricas, con surcos de una profundidad de 150 nm y $2\text{ }\mu\text{m}$ de ancho. En concordancia con nuestros resultados, la alineación de osteoblastos bovinos sobre superficies anisotrópicas de poliestireno incrementó casi en un

20% al aumentar la profundidad de los surcos de 50 a 150 nm [Lenhert y col. 2005]. Asimismo, se ha observado una tendencia similar en la orientación de fibroblastos de rata cultivados sobre sustratos de silicona al incrementar el ancho de los surcos [Loesberg y col. 2007]. Cabe destacar que las superficies G2 presentan pequeñas irregularidades de rango nanométrico con características topográficas similares a las de las muestras G1, probablemente originadas durante el proceso de abrasión mecánica. Aunque la orientación celular puede estar influenciada por estas características nanométricas, las diferencias observadas en la tasa de alineación celular entre las muestras G1 y G2 han de atribuirse a las irregularidades en el rango submicrométrico presentes en las superficies G2. Las células cultivadas sobre las superficies mecanizadas exhiben un citoesqueleto de actina organizado en fibras de estrés orientadas en la dirección los surcos. La formación de estas fibras depende de la activación de receptores transmembrana de la familia de las integrinas durante el proceso de adhesión celular. Las integrinas conectan los filamentos de actina a la FN secretada por las células en forma de dímeros solubles, y esta conexión condiciona la organización de una densa malla de fibrillas insolubles interconectadas sobre la superficie celular [Wierzbicka-Patynowski y Schwarzbauer 2003]. Nuestros resultados indican que ambos tipos celulares son capaces de ensamblar fibrillas de FN que se orientan paralelamente a los filamentos de actina, tal y como se ha descrito en células osteoblásticas cultivadas sobre superficies mecanizadas de Ti comercial puro [Lüthen y col. 2005].

El fenómeno de orientación por contacto en células endoteliales y epiteliales implica la formación de protrusiones de la membrana celular inmediatamente después de que las células interaccionen con el material [Texeira y col. 2003, Dalby y col. 2004]. Por lo tanto, cabría esperar que las células osteoblásticas y precursoras detectasen los surcos submicrométricos generados en la aleación Ti64 a través de la formación de filopodios y lamelipodios. Nuestros resultados indican que tras 1 h de incubación sobre las superficies pulidas ambos tipos celulares adoptan una morfología expandida y redondeada emitiendo lamelipodios en todas las direcciones, tal y como se ha descrito por otros autores [Fujita y col. 2009]. Sin embargo, sobre las superficies mecanizadas las células exhiben un mayor número de filopodios dispuestos mayoritariamente de forma perpendicular a las crestas de los surcos. En este sentido, Dalby y col. (2004) observaron que fibroblastos humanos son capaces de detectar topografías ordenadas con surcos nanométricos mediante la actividad sensorial de los filopodios. Texeira y col. (2003) llevaron a cabo un estudio de microscopía en células epiteliales vivas cultivadas sobre sustratos de silicona con surcos submicrométricos y observaron que las células se alineaban en la dirección de los surcos a la vez que replegaban lamelipodios

periódicamente siguiendo la geometría del sustrato. Por lo tanto, es razonable especular que la alineación de células osteoblásticas y precursoras sobre superficies anisotrópicas de la aleación Ti64 puede ser consecuencia de la formación de extensiones citoplasmáticas en la dirección de los surcos a tiempos muy tempranos de adhesión al material.

Dado que la formación de filopodios y lamelipodios depende del ensamblaje del citoesqueleto, quisimos estudiar su reorganización en células incubadas durante cortos periodos de tiempo sobre las superficies submicrométricas de la aleación Ti64. Trabajos realizados por otros autores indican que la distribución de los filamentos de actina sobre superficies ordenadas juega un papel clave en el proceso de orientación celular [Walboomers y col. 1998, Hamilton y col. 2009, 2010]. Además, se ha sugerido que la acumulación de adhesiones focales en las crestas de los surcos podría promover la reorganización de las fibras de estrés de forma paralela a la topografía del sustrato [Biggs y col. 2008, Fujita y col. 2009]. Los datos recogidos en esta memoria indican que tanto las fibras de estrés como los contactos focales de células osteoblásticas y precursores se alinean en la dirección de los surcos sobre las superficies anisotrópicas. Oakley y Brunette (1993) detectaron la formación de haces de actina localizados en los bordes de los surcos en fibroblastos cultivados sobre sustratos de silicio recubiertos de Ti, con surcos de 3 μm de profundidad y 30 μm de ancho. Por otro lado, Dalby y col. (2006b) observaron que la orientación de células osteoprogenitoras sobre superficies de silicona con surcos de unos 500 nm de profundidad y 5 μm de ancho requiere la alineación de los contactos focales. Además, se ha observado que el tamaño de los contactos focales de células osteoblásticas de ratón cultivadas sobre superficies con topografías nanométricas de ácido poliláctico y poliestireno incrementó al aumentar la profundidad de las hendiduras de su superficie de 14 a 45 nm [González-García y col. 2010]. En concordancia con la literatura, nuestros datos revelan que la longitud de los contactos focales de ambos tipos celulares aumenta sobre las superficies mecanizadas, lo que podría ser debido a la acumulación de integrinas a consecuencia de tensiones mecánicas ejercidas sobre citoesqueleto. De hecho, el empleo de superficies elásticas con topografías regulares o de bolas nanométricas de poliestireno carboxilado que inducen tensiones en el citoesqueleto de fibroblastos conduce a la formación de adhesiones focales maduras de gran tamaño [Balaban y col. 2001, Galbraith y col. 2002]. Por el contrario, cuando existe menor tensión en el citoesqueleto, las adhesiones que establecen las células con el sustrato son más pequeñas e inmaduras.

La información existente acerca del papel que juegan los microtúbulos en el proceso de orientación por contacto es contradictoria [Wojciak-Stothard y col. 1996, Théry y col. 2006, Théry y Bornens 2006]. Algunos autores han observado que los cambios en la morfología y la polarización celular no requieren la participación de los microtúbulos, mientras que otros han

detectado que el citoesqueleto de tubulina está implicado en el proceso de orientación por contacto [Oakley y Brunette 1993, Stepien y col. 1999, Krzysiek-Maczka y col. 2009]. Además, se ha observado que la inhibición de la nucleación de microtúbulos en fibroblastos y células epiteliales disminuye su orientación sobre superficies con topografías ordenadas de polisiloxano de vinilo [Hamilton y col. 2009]. Los datos incluidos en la presente memoria indican que tanto los filamentos de actina como la tubulina acetilada, característica de microtúbulos estables, se orientan en la dirección de los surcos sobre las superficies submicrométricas de Ti64. En este sentido, Oakley y Brunette (1993) observaron en fibroblastos humanos cultivados sobre superficies ordenadas de Ti que los microtúbulos son la primera estructura que se orienta en la dirección de los surcos, antes que los filamentos de actina. Aunque no hemos determinado si la reorganización de estas estructuras ocurre de forma secuencial el tiempo, es posible especular que la organización de microtúbulos de células osteoblásticas y precursores mesenquimales precede a la reorganización de las fibras de estrés y participa en el mantenimiento de la morfología celular sobre superficies anisotrópicas de Ti64.

Los datos recogidos en esta memoria indican que la orientación celular por contacto sobre superficies anisotrópicas de Ti64 implica la participación de prolongaciones celulares, filamentos de actina y tubulina, proteínas de la MEC y contactos focales. A continuación, quisimos estudiar los mecanismos moleculares implicados en el proceso de orientación de hOBs y hMSCs sobre superficies submicrométricas de la aleación. La GTPasa RhoA a través de su efector ROCK modula el ensamblaje de las adhesiones focales, participa en la polimerización del citoesqueleto celular y promueve la migración celular [Etienne-Manneville y Hall 2004, Raftopoulou y Hall 2004, Vicente-Manzanares y col. 2009]. Nuestros datos revelan que la actividad basal de RhoA tras 2 o 24 h de incubación y la de ROCK, tras 24 h en cultivo es superior en células hMSCs que en hOBs. Estas diferencias podrían estar relacionadas con la distinta capacidad de migración que poseen ambos tipos celulares. De hecho, las células mesenquimales de médula ósea presentan una elevada tasa de migración mientras que para desempeñar su función los osteoblastos no requieren grandes desplazamientos [Yoo y col. 1998, Chamberlain y col. 2007]. Dado que la vía RhoA/ROCK participa en la formación de contactos focales y fibras de estrés durante el proceso de adhesión celular, cabe esperar que su actividad varíe en función del tiempo de incubación. En efecto, nuestros resultados indican que las actividades de RhoA y ROCK disminuyen entre 2 y 24 h, tiempo tras el cual las células presentan una morfología expandida con el citoesqueleto bien organizado en fibras de estrés. En este sentido, Ren y col. (1999) detectaron que la actividad de Rho en fibroblastos cultivados

sobre plástico de cultivo recubierto con FN aumenta entre 60 y 90 min de incubación, disminuyendo posteriormente.

Datos existentes en la literatura indican que RhoA interviene en la orientación de células del epitelio corneal y células de tendón sobre superficies ordenadas de cuarzo y silicón, respectivamente [Rajnicek y col. 2008, Zhu y col. 2010]. Hasta la fecha se desconoce si esta proteína está implicada en la orientación por contacto de células formadoras de hueso y precursores mesenquimales sobre superficies ordenadas de Ti64. Nuestros resultados indican que la actividad RhoA de ambos tipos celulares incrementa sobre las superficies anisotrópicas, en comparación con las superficies pulidas. Respecto a su localización, la proteína total, activa e inactiva, se acumula en las prolongaciones citoplasmáticas y zonas de contacto con las crestas de los surcos sobre superficies mecanizadas. En otros tipos celulares, tales como fibroblastos murinos o células T, se ha detectado que la acumulación de RhoA en las prolongaciones citoplasmáticas corresponde a su forma activa, lo que sugiere que la señal observada en hMSCs y hOB cultivados sobre las superficies anisotrópicas podría corresponder principalmente a la GTPasa activa [Pertz y col. 2006, Heasman y col. 2010]. Curiosamente, la actividad ROCK incrementa en hMSCs cultivadas sobre las superficies mecanizadas, mientras que no se modifica en hOBs. En este sentido, recientemente se ha observado en tenocitos cultivados sobre sustratos con surcos ordenados que la adquisición de una morfología celular alargada conduce a un aumento en la actividad RhoA y a la disminución de la actividad ROCK [Zhu y col. 2010].

La participación de la vía RhoA/ROCK en el proceso de orientación celular sobre las superficies submicrométricas se investigó empleando los compuestos C3 transferasa y HF, que atenúan las actividades de RhoA y ROCK respectivamente. Otros autores han observado que la inhibición de la actividad RhoA en distintos tipos celulares, tales como células mesenquimales o fibroblastos conduce a cambios en la morfología celular [Hall y Nobes 2000, Jaganathan y col. 2007]. Nuestros datos indican que el tratamiento con C3 promueve un aumento en el tamaño de ambos tipos celulares e induce la desorganización del citoesqueleto de actina. Además, el tratamiento con C3 provocó una disminución de la localización de esta GTPasa en las prolongaciones citoplasmáticas y una mayor acumulación en la zona perinuclear. De nuevo, estos datos apuntan a que las acumulaciones de RhoA detectadas en las extensiones citoplasmáticas de ambos tipos celulares corresponden a la forma activa de la GTPasa. Del mismo modo, la atenuación de la actividad ROCK provocó la desorganización del citoesqueleto de actina de hMSCs y hOBs y un aumento en el área celular, tal y como se ha descrito en células HeLa y COS-7 [Ishizaki y col. 1996, Uehata y col. 1997]. Con el fin de evaluar si la ruta RhoA/ROCK participa en la orientación inicial o en el mantenimiento de la alineación de las

células sobre las superficies mecanizadas, los inhibidores se añadieron en el momento de la siembra o 24 h después. Los resultados indicaron que RhoA participa en la orientación inicial de células hMSCs sobre superficies submicrométricas a través de su efector ROCK. En este sentido, Provenzano y col. (2008) observaron que la vía RhoA/ROCK participa en la reorganización de las fibras de colágeno que conducen a la orientación por contacto de células de cáncer de mama humanas. Sin embargo, cuando los inhibidores se añaden 24 h después de la siembra, sólo la atenuación de RhoA es capaz de alterar la orientación de hMSCs. Estos datos indican que RhoA modula la disposición ordenada de células hMSCs a través de ROCK sobre las superficies submicrométricas en las primeras etapas de adhesión, pero no cuando las células ya están alineadas sobre el sustrato. Por otro lado, aunque la actividad de RhoA aumente sobre superficies mecanizadas, ni la atenuación de esta GTPasa ni la de su efector ROCK modifica la orientación de hOBs sobre las superficies submicrométricas. Estos datos apuntan a que existen otras vías de señalización implicadas en la regulación de la orientación por contacto de hOBs. En efecto, otros autores han detectado la participación de la GTPasa Rac1 en macrófagos o la proteína RACK1 en células de carcinoma mamario en el proceso de orientación por contacto sobre superficies ordenadas [Allen y col. 1997, Dalby y col. 2008]. Ya que la vía de señalización mediada por Rac1 está implicada en el proceso de adhesión de células osteoblásticas, es razonable especular que esta GTPasa participe en el proceso de orientación de hOBs sobre las superficies mecanizadas y en el mantenimiento de la alineación tras la atenuación de RhoA [Nobes y Hall 1999, Banyard y col. 2000, Fukuyama y col. 2004, Lane y col. 2012]. Por último, cabe señalar que la elongación celular que sufren ambos tipos celulares sobre las superficies mecanizadas está controlada por RhoA, pero no por ROCK. Además, la atenuación de la actividad de RhoA, pero no la de ROCK, provoca la desorganización de microtúbulos estables en ambos tipos celulares. Estos datos sugieren que RhoA controla la reorganización de los microtúbulos a través de un efector diferente a ROCK y que el ensamblaje de estas estructuras modula la elongación celular sobre las superficies mecanizadas. En este sentido, datos disponibles en la literatura indican que RhoA modula la organización de microtúbulos estables a través de su efector mDia en células HeLa o 3T3 [Ishizaki y col. 2001, Palazzo y col. 2001].

Las superficies con topografías ordenadas son capaces de regular diversas funciones celulares *in vitro* tales como adhesión, proliferación o diferenciación de células precursoras hacia el linaje osteoblástico [Dalby y col. 2006a, 2007, Oh y col. 2009, Pot y col. 2010, Lamers y col. 2010, McNamara y col. 2010, Watari y col. 2012]. Como se ha mencionado anteriormente, la mayoría de estos trabajos emplean superficies anisotrópicas con modificaciones en su composición química, lo que dificulta atribuir los efectos observados a una variable en

particular. Los datos incluidos en esta memoria indican que las modificaciones ensayadas en la aleación Ti64, que afectan exclusivamente a su topografía, favorecen la adhesión inicial y la proliferación de hMSCs mientras que no alteran la respuesta de hOBs. Aunque los osteoblastos derivan de precursores mesenquimales, el comportamiento de estos dos tipos celulares sobre superficies de Ti64 puede ser muy diferente [Deligianni y col. 2001, Anselme y col. 2002]. Así, se ha observado que la adhesión y proliferación de células MSC cultivadas sobre superficies mecanizadas de la aleación Ti64 recubiertas con hidroxiapatita incrementa al aumentar el tamaño de los surcos [Deligianni y col 2001]. Por el contrario, estas mismas funciones celulares no se alteraron tras cultivar osteoblastos sobre superficies similares con surcos de entre 70 nm y 1,2 μ m [Anseme y col. 2002]. Estas observaciones apuntan a que las células precursoras en un estado indiferenciado son más sensibles a las topografías ordenadas que los osteoblastos maduros.

La morfología que adoptan las células mesenquimales en función de la geometría del sustrato puede influir en su diferenciación hacia un linaje determinado [Kilian y col. 2010, Peng y col. 2011]. En concreto, se ha observado que las topografías que inducen un aumento en la contractilidad celular favorecen la maduración hacia el linaje osteoformador, mientras que las superficies que permiten a las células adoptar una morfología redondeada, sin tensiones en el citoesqueleto, promueven su diferenciación adipogénica. Ya que la generación de superficies anisotrópicas en la aleación Ti64 condiciona la disposición alargada y ordenada de células hMSCs, cabe esperar que estas topografías promuevan su diferenciación osteogénica. En efecto, los datos incluidos en la presente memoria indican que las superficies mecanizadas de la aleación inducen un aumento en la actividad FA y en la secreción de OPN, marcadores característicos de diferenciación osteoblástica. En este sentido, Zhu y col. (2011) detectaron un aumento en la expresión de Runx2, OC y OPN en células hMSCs cultivadas sobre superficies con surcos micrométricos, fabricadas con nanofibras biológicas. Por otro lado, la expresión de Runx2, OC y BSP en células embrionarias de ratón fue superior sobre sustratos con topografías ordenadas de ácido poliláctico que sobre superficies lisas [Smith y col. 2009]. Todos estos datos apuntan a que el alineamiento y la elongación que sufren las hMSCs sobre superficies ordenadas de Ti64 favorecen su diferenciación hacia el linaje osteoblástico, probablemente debido a las señales mecánicas que ejerce el sustrato sobre las células. Como se ha comentado anteriormente, las GTPasas de la familia de Rho participan en la regulación de la organización del citoesqueleto de actina en respuesta a señales extracelulares. Ya que la actividad de RhoA y ROCK de células hMSCs incrementa sobre las superficies mecanizadas, es plausible especular que el mecanismo mediante el cual superficies anisotrópicas de Ti64 promueven su diferenciación osteoblástica esté relacionado con la activación de esta vía de señalización. En

este sentido, Arnsdorf y col. (2009) detectaron que la vía de señalización RhoA/ROCK está implicada en la diferenciación de células progenitoras hacia el linaje osteoformador inducida por flujo de fluidos. Además, McBeath y col. (2004) observaron que tras sobreexpresar la forma activa de RhoA en células hMSCs mediante el empleo de adenovirus recombinantes se inducía diferenciación osteoblástica. Por otro lado, pocos autores han estudiado el efecto de las topografías ordenadas sobre el proceso de diferenciación de precursores mesenquimales hacia linaje adipogénico. Como se ha comentado anteriormente, las superficies que permiten a las células adoptar una morfología redondeada, sin tensiones en el citoesqueleto, promueven su diferenciación adipogénica, mientras que superficies con características topográficas que inducen fuertes tensiones en el esqueleto de células mesenquimales inhiben su diferenciación a adipocitos [Kilian y col. 2010, Yang y col. 2012]. Ya que sobre las superficies mecanizadas las células adquieren una morfología alargada con el citoesqueleto de actina organizado en fibras de estrés bien definidas, cabría esperar que estas topografías inhiban su diferenciación hacia linaje adipogénico. Sin embargo, nuestros resultados indican que la generación de surcos en la superficie de la aleación Ti64 no afecta a la capacidad de diferenciación adipogénica de hMSCs.

Tomados en conjunto, los resultados incluidos en la presente memoria indican que las superficies de Ti64 modificadas mediante abrasión mecánica permiten controlar la orientación celular a través de irregularidades periódicas que alteran su topografía. En concreto, se han seleccionado topografías submicrométricas que inducen la alineación de células precursoras mesenquimales sobre la aleación Ti64 a través de la participación de la vía de señalización mediada por RhoA. Además, se ha identificado que estas superficies anisotrópicas favorecen la maduración de células precursoras hacia linaje osteoformador y no alteran su diferenciación a adipocitos. Por todo ello, cabe especular que el empleo de la aleación Ti64 con topografías ordenadas que mimeticen las características naturales del hueso favorecería la formación organizada del tejido óseo, lo que redundaría en una mejor osteointegración del implante.

CONCLUSIONES

De todo lo expuesto se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. Los recubrimientos híbridos DLC-PTFE-h permiten la correcta adhesión y proliferación de células osteoformadoras y precursoras mesenquimales humanas mientras que los recubrimientos DLC-PDMS-h las dificultan.
2. Las topografías ordenadas de la aleación Ti64 generadas mediante abrasión mecánica, con rugosidades promedio en los rangos nanométrico y submicrométrico, promueven la orientación y elongación de células osteoformadoras y precursoras mesenquimales humanas en la dirección de los surcos y favorecen la adhesión de las precursoras.
3. El fenómeno de orientación por contacto de ambos tipos celulares sobre topografías ordenadas submicrométricas de la aleación Ti64 implica formación de filopodios y la orientación temprana de fibras de estrés, microtúbulos y contactos focales en la dirección de los surcos.
4. La GTPasa RhoA participa en el proceso de orientación de células precursoras humanas sobre topografías ordenadas submicrométricas de la aleación Ti64 a través de su efector ROCK, pero no en el de células osteoformadoras.
5. Las topografías ordenadas submicrométricas de la aleación Ti64 favorecen la proliferación y la maduración de células precursoras mesenquimales humanas hacia el linaje osteoformador.

BIBLIOGRAFÍA

- ❖ Alakoski E, Kiuru M, Tiainen VM, Anttila A. Adhesion and quality test for tetrahedral amorphous carbon coating process. *Diam Relat Mater*. 2003;12:2115-8.
- ❖ Allen WE, Jones GE, Pollard JW, Ridley AJ. Rho, Rac and Cdc42 regulate actin organization and cell adhesion in macrophages. *J Cell Sci*. 1997;110:707-20.
- ❖ Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials*. 2000;21:667-81.
- ❖ Anselme K, Linez P, Biggerelle M, Le Maguer D, Le Maguer A, Hardouin P, Hildebrand HF, Iost A, Leroy JM. The relative influence of the topography and chemistry of TiAl6V4 surfaces on osteoblastic cell behaviour. *Biomaterials*. 2000;21:1567-77
- ❖ Anselme K, Biggerelle M, Noël B, Iost A, Hardouin P. Effect of grooved titanium substratum on human osteoblastic cell growth. *J Biomed Mater Res*. 2002;60:529-40.
- ❖ Anselme K, Ponche A, Biggerelle M. Relative influence of surface topography and surface chemistry on cell response to bone implant materials. Part 2: biological aspects. *Proc Inst Mech Eng H*. 2010;224:1487-507.
- ❖ Anttila A, Lappalainen R, Tiainen VM, Hakovirta M. Superior attachment of high-quality hydrogen-free amorphous diamond films to solid materials. *Adv Mater*. 1997;9:1161-4.
- ❖ Anttila A, Tiainen VM, Kiuru M, Alakoski E, Arstila K. Preparation of diamond like carbon-polymer hybrid films with filtered pulsed arc discharge method. *Surf Eng*. 2003;19:425-8.
- ❖ Arnsdorf EJ, Tummala P, Kwon RY, Jacobs CR. Mechanically induced osteogenic differentiation - the role of RhoA, ROCKII and cytoskeletal dynamics. *J Cell Sci*. 2009;122(Pt 4):546-53.
- ❖ Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997;275:964-7.
- ❖ Aubin JE, Liu F, Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan LG In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan LG, editors. *Principles of bone biology*. Aubin: Academic Press. 1996;51-67.
- ❖ Bächle M, Kohal RJ. A systematic review of the influence of different titanium surfaces on proliferation, differentiation and protein synthesis of osteoblast-like MG63 cells. *Clin Oral Implants Res*. 2004;15(6):683-92.
- ❖ Balaban NQ, Schwarz US, Riveline D, Goichberg P, Tzur G, Sabanay I, Mahalu D, Safran S, Bershadsky A, Addadi L, Geiger B. Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates. *Nat Cell Biol*. 2001;3:466-72.
- ❖ Ball M, Grant DM, Lo WJ, Scotchford CA. The effect of different surface morphology and roughness on osteoblast-like cells. *J Biomed Mater Res A* 2008;86:637-47.
- ❖ Banyard J, Anand-Apte B, Symons M, Zetter BR. Motility and invasion are differentially modulated by Rho family GTPases. *Oncogene*. 2000;19:580-91.
- ❖ Bergin E, Levine JS, Koh JS, Lieberthal W. Mouse proximal tubular cell-cell adhesion inhibits apoptosis by a cadherin-dependent mechanism. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2000;278:758-68.
- ❖ Bershadsky AD, Ballestrem C, Carramusa L, Zilberman Y, Gilquin B, Khochbin S, Alexandrova AY, Verkhovsky AB, Shemesh T, Kozlov MM. Assembly and mechanosensory function of focal adhesions: experiments and models. *Eur J Cell Biol*. 2006; 85:165-173.
- ❖ Biggs MJP, Richards RG, McFarlane S, Wilkinson CDW, Oreffo ROC, Dalby MJ. Adhesion formation of primary human osteoblasts and the functional response of mesenchymal stem cells to 330 nm deep microgrooves. *J R Soc Interface*. 2008;5:1231-42
- ❖ Bilezikian JP, Raisz LG, Martin TJ. *Principles of bone biology*. Elsevier Science. 2008. ISBN: 978-0-12-373884-4.
- ❖ Boyan BD, Hummert TW, Dean DD, Schwartz Z. Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. *Biomaterials*. 1996;17:137-46.

- ❖ Bonewald LF, Johnson ML. Osteocytes, Mechanosensing and Wnt Signaling. *Bone*. 2008; 42: 606-615.
- ❖ BurrIDGE K, Fath K, Kelly T, Nuckolls G, Turner C. Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Annu Rev Cell Biol*. 1988; 4:487-525.
- ❖ Campbell C, Risueno RM, Salati S, Guezguez B, Bhatia M. Signal control of hematopoietic stem cell fate: Wnt, Notch, and Hedgehog as the usual suspects. *Curr Opin Hematol*. 2008;15:319-25.
- ❖ Chai F, Mathis N, Blanchemain N, Meunier C, Hildebrand HF. Osteoblast interaction with DLC-coated Si substrates. *Acta Biomater*. 2008;4:1369-81.
- ❖ Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells*. 2007;25:2739-49.
- ❖ Charest JL, García AJ, King WP. Myoblast alignment and differentiation on cell culture substrates with microscale topography and model chemistries. *Biomaterials*. 2007;28:2202-10.
- ❖ Chen M, Zamora PO, Som P, Peña LA, Osaki S. Cell attachment and biocompatibility of polytetrafluoroethylene (PTFE) treated with glow-discharge plasma of mixed ammonia and oxygen. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2003;14:917-35.
- ❖ Chiarugi P, Giannoni E. Anoikis: a necessary death program for anchorage-dependent cells. *Biochem Pharmacol*. 2008;76:1352-64.
- ❖ Cooper RR, Milgram JW, Robinson RA. Morphology of the osteon. An electron microscopic study. *J Bone Joint Surg Am*. 1966;48:1239-71.
- ❖ Curtis A, Wilkinson C. Topographical control of cells. *Biomaterials*. 1997;18(24):1573-83.
- ❖ Crouch AS, Miller D, Luebke KJ, Hu W. Correlation of anisotropic cell behaviors with topographic aspect ratio. *Biomaterials*. 2009;30:1560-7.
- ❖ Dalby MJ, Gadegaard N, Riehle MO, Wilkinson CD, Curtis AS. Investigating filopodia sensing using arrays of defined nano-pits down to 35 nm diameter in size. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004;36:2005-15.
- ❖ Dalby MJ, Riehle MO, Sutherland DS, Agheli H, Curtis AS. Morphological and microarray analysis of human fibroblasts cultured on nanocolumns produced by colloidal lithography. *Eur Cell Mater*. 2005;9:1-8;
- ❖ Dalby MJ, McCloy D, Robertson M, Agheli H, Sutherland D, Affrossman S, Oreffo RO. Osteoprogenitor response to semi-ordered and random nanotopographies. *Biomaterials*. 2006a; 27:2980-7.
- ❖ Dalby MJ, McCloy D, Robertson M, Wilkinson CD, Oreffo RO. Osteoprogenitor response to defined topographies with nanoscale depths. *Biomaterials*. 2006b;27: 1306-1315.
- ❖ Dalby MJ, Gadegaard N, Curtis AS, Oreffo RO. Nanotopographical control of human osteoprogenitor differentiation. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2007;2:129-38.
- ❖ Dalby MJ, Hart A, Yarwood SJ. The effect of the RACK1 signalling protein on the regulation of cell adhesion and cell contact guidance on nanometric grooves. *Biomaterials*. 2008;29:282-9.
- ❖ Deligianni DD, Katsala N, Ladas S, Sotiropoulou D, Amedee J, Missirlis YF. Effect of surface roughness of the titanium alloy Ti-6Al-4V on human bone marrow cell response and on protein adsorption. *Biomaterials*. 2001;22: 1241-51.
- ❖ Devescovi V, Leonardi E, Ciapetti G, Cenni E. Growth factors in bone repair. *Chir Organi Mov*. 2008;92:161-168.
- ❖ den Braber ET, de Ruijter JE, Ginsel LA, von Recum AF, Jansen JA. Orientation of ECM protein deposition, fibroblast cytoskeleton, and attachment complex components on silicone microgrooved surfaces. *J Biomed Mater Res*. 1998;40: 291-300.

- ❖ Di Mundo R, Nardulli M, Milella A, Favia P, d'Agostino R, Gristina R. Cell adhesion on nanotextured slippery superhydrophobic substrates. *Langmuir*. 2011;27:4914-21.
- ❖ Discher DE, Janmey P, Wang YL. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science*. 2005;310:1139-43.
- ❖ Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8:315-317.
- ❖ Ducy P, Desbois C, Boyce B, Pinero G, Story B, Dunstan C, Smith E, Bonadio J, Goldstein S, Gundberg C, Bradley A, Karsenty G. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature*. 1996;382:448-52.
- ❖ Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*. 1997;89:747-54.
- ❖ Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology. *Nature*. 2002;420:629-35.
- ❖ Everts V, Delaissé JM, Korper W, Jansen DC, Tigchelaar-Gutter W, Saftig P, Beertsen W. The bone lining cell: its role in cleaning Howship's lacunae and initiating bone formation. *J Bone Miner Res*. 2002;17:77-90.
- ❖ Fauchoux N, Schweiss R, Lützwow K, Werner C, Groth T. Self-assembled monolayers with different terminating groups as model substrates for cell adhesion studies. *Biomaterials*. 2004;25:2721-30.
- ❖ Flade K, Lau C, Mertig M, Pompe W. Osteocalcin-controlled dissolution-reprecipitation of calcium phosphate under biomimetic conditions. *Chem Mater*. 2001;13:3596.
- ❖ Fletcher DA, Mullins RD. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature*. 2010;463:485-92.
- ❖ Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, Luriá EA, Ruadkow IA. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol*. 1974;2:83-92.
- ❖ Fujita S, Ohshima M, Iwata H. Time-lapse observation of cell alignment on nanogrooved patterns. *J R Soc Interface*. 2009;6:S269-77.
- ❖ Fukuyama R, Fujita T, Azuma Y, Hirano A, Nakamuta H, Koida M, Komori T. Statins inhibit osteoblast migration by inhibiting Rac-Akt signaling. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;315:636-42.
- ❖ Galbraith CG, Yamada KM, Sheetz MP. The relationship between force and focal complex development. *J Cell Biol*. 2002;159:695-705.
- ❖ Gallardo-Moreno AM, Pacha-Olivenza MA, Saldaña L, Pérez-Giraldo C, Bruque JM, Vilaboa N, González-Martín ML. In vitro biocompatibility and bacterial adhesion of physico-chemically modified Ti6Al4V surface by means of UV irradiation. *Acta Biomater*. 2009;5:181-92.
- ❖ García AJ. Get a grip: integrins in cell-biomaterial interactions. *Biomaterials*. 2005;26:7525-9.
- ❖ Geetha M, Singh AK, Asokamani R, Gogia AK. Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants - A review. *Prog Mater Sci*. 2009;54:397-425.
- ❖ González-García C, Sousa SR, Moratal D, Rico P, Salmerón-Sánchez M. Effect of nanoscale topography on fibronectin adsorption, focal adhesion size and matrix organisation. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2010;77:181-90.
- ❖ Goode BL, Eck MJ. Mechanism and function of formins in the control of actin assembly. *Annu Rev Biochem*. 2007;76:593-627.
- ❖ Goodman SB, Gómez Barrena E, Takagi M, Konttinen YT. Biocompatibility of total joint replacements: A review. *J Biomed Mater Res A* 2009;90:603-18.
- ❖ Gregoire FM, Smas CM, Sul HS. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev*. 1998;78:783-809.

- ❖ Hall A, Nobes CD. Rho GTPases: molecular switches that control the organization and dynamics of the actin cytoskeleton. *Phil Trans R Soc Lond B*. 2000;355: 965-70.
- ❖ Hamilton DW, Oakley C, Jaeger NA, Brunette DM. Directional change produced by perpendicularly-oriented microgrooves is microtubule-dependent for fibroblasts and epithelium. *Cell Motil Cytoskeleton*. 2009;66:260-71.
- ❖ Hamilton DW, Oates CJ, Hasanzadeh A, Mittler S. Migration of periodontal ligament fibroblasts on nanometric topographical patterns: influence of filopodia and focal adhesions on contact guidance. *PLoS One*. 2010;5:e15129.
- ❖ Heasman SJ, Carlin LM, Cox S, Ng T, Ridley AJ. Coordinated RhoA signaling at the leading edge and uropod is required for T cell transendothelial migration. *J Cell Biol*. 2010;190:553-63.
- ❖ Heino J, Huhtala M, Käpylä J, Johnson MS. Evolution of collagen-based adhesion systems. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009;41:341-8.
- ❖ Hiraoka Y, Kimbara K. Rapid assessment of the physiological status of the polychlorinated biphenyl degrader *Comamonas testosteroni* TK102 by flow cytometry. *Appl Environ Microbiol*. 2002;68:2031-5.
- ❖ Hsu S, Tang CM, Chiu JJ, Liao TC, Lin CC, Iwata H. Cell migration rate on poly(ϵ -caprolactone)/poly(ethylene glycol) diblock copolymers and correlation with the material sliding angle. *Macromol Biosci*. 2007;7:482-90.
- ❖ Hofmann C, Obermeier F, Artinger M, Hausmann M, Falk W, Schoelmerich J, Rogler G, Grossmann J. Cell-cell contacts prevent anoikis in primary human colonic epithelial cells. *Gastroenterology*. 2007;132:587-600.
- ❖ Huangfu D, Osafune K, Maehr R, Guo W, Eijkelenboom A, Chen S, Muhlestein W, Melton DA. Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat Biotechnol*. 2008;26:1269-75.
- ❖ Ino K, Ito A, Wu Y, Saito N, Hibino E, Takai O, Honda H. Application of ultra-water-repellent surface to cell culture. *J Biosci Bioeng*. 2007;104:420-3.
- ❖ Ishizaki T, Maekawa M, Fujisawa K, Okawa K, Iwamatsu A, Fujita A, Watanabe N, Saito Y, Kakizuka A, Morii N, Narumiya S. The small GTP-binding protein Rho binds to and activates a 160 kDa Ser/Thr protein kinase homologous to myotonic dystrophy kinase. *Embo J*. 1996;15:1885-93.
- ❖ Ishizaki T, Morishima Y, Okamoto M, Furuyashiki T, Kato T, Narumiya S. Coordination of microtubules and the actin cytoskeleton by the Rho effector mDia1. *Nat Cell Biol*. 2001;3:8-14.
- ❖ Ishizaki T, Saito N, Takai O. Correlation of cell adhesive behaviors on superhydrophobic, superhydrophilic, and micropatterned superhydrophobic/superhydrophilic surfaces to their surface chemistry. *Langmuir*. 2010;26:8147-54.
- ❖ Ito T, Maekawa A, Yamana K, Yoshizumi T, Sunada M. Use of an expanded polytetrafluoroethylene patch as an artificial leaflet in mitral valve plasty: an early experience. *Ann Thorac Surg*. 2010;89:1620-4.
- ❖ Jaffe AB, Hall A. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2005;21:247-69.
- ❖ Jaganathan BG, Ruester B, Dressel L, Stein S, Grez M, Seifried E, Henschler R. Rho inhibition induces migration of mesenchymal stromal cells. *Stem Cells*. 2007;25:1966-74.
- ❖ Jayaraman M, Meyer U, Bühner M, Joos U, Wiesmann HP. Influence of titanium surfaces on attachment of osteoblast-like cells in vitro. *Biomaterials*. 2004;25:625-31.
- ❖ Kamitani K, Teranishi T. Development of water-repellent glass improved water-sliding property and durability. *J Sol-Gel Sci Techn*. 2003;26:823-5.

- ❖ Karuri NW, Liliensiek S, Teixeira AI, Abrams G, Campbell S, Nealey PF, Murphy CJ. Biological length scale topography enhances cell-substratum adhesion of human corneal epithelial cells. *J Cell Sci.* 2004;117:3153-64.
- ❖ Kennedy SB, Washburn NR, Simon CG, Amis EJ. Combinatorial screen of the effect of surface energy on fibronectin-mediated osteoblast adhesion, spreading and proliferation. *Biomaterials.* 2006;27:3817-24.
- ❖ Kilian KA, Bugarija B, Lahn BT, Mrksich M. Geometric cues for directing the differentiation of mesenchymal stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010;107:4872-7.
- ❖ Kinnari TJ, Soininen A, Esteban J, Zamora N, Alakoski E, Kouri VP. Adhesion of staphylococcal and Caco-2 cells on diamond-like carbon polymer hybrid coating. *J Biomed Mater Res A.* 2008;86:760-8.
- ❖ Kiuru M, Alakoski E. Low sliding angles in hydrophobic and oleophobic coatings prepared with plasma discharge method. *Mater Lett.* 2004;58:2213-6.
- ❖ Klenkler BJ, Griffith M, Becerril C, West-Mays JA, Sheardown H. EGF-grafted PDMS surfaces in artificial cornea applications. *Biomaterials.* 2005;26:7286-96.
- ❖ Komori T. Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. *J Cell Biochem.* 2006;99:1233-9.
- ❖ Krzysiek-Maczka G, Michalik M, Madeja Z, Korohoda W. Involvement of cytoskeleton in orientation of cell division in contact guided cells. *Folia Biol (Krakow).* 2010;58:21-7.
- ❖ Kurtz SM, Lau E, Ong K, Zhao K, Kelly M, Bozic KJ. Future young patient demand or primary and revision joint replacement: national projections from 2010 to 2030. *Clin Orthop Relat Res.* 2009;467:2606-12.
- ❖ Lane SW, De Vita S, Alexander KA, Karaman R, Milsom MD, Dorrance AM, Purdon A, Louis L, Bouxsein ML, Williams DA. Rac signaling in osteoblastic cells is required for normal bone development but is dispensable for hematopoietic development. *Blood.* 2012;119:736-44.
- ❖ Lamers E, Walboomers XF, Domanski M, te Riet J, van Delft FC, Luttge R, Winnubst LA, Gardeniers HJ, Jansen JA. The influence of nanoscale grooved substrates on osteoblast behavior and extracellular matrix deposition. *Biomaterials.* 2010;31:3307-16.
- ❖ Lappalainen R, Heinonen H, Anttila A, Santavirta S. Some relevant issues related to the use of amorphous diamond coatings for medical applications. *Diam Relat Mater.* 1998;7:482-5.
- ❖ Lappalainen R, Santavirta SS. Potential of coatings in total hip replacement. *Clin Orthop Relat Res.* 2005;430:72-9.
- ❖ Leclerc E, Sakai Y, Fujii T. Cell Culture in 3-Dimensional Microfluidic Structure of PDMS (polydimethylsiloxane). *Biomed Microdevices.* 2003;2:109-14.
- ❖ Lee YM, Lee EJ, Yee ST, Kim BI, Choe ES, Cho HW. In vivo and in vitro response to electrochemically anodized Ti-6Al-4V alloy. *J Mater Sci Mater Med.* 2008;19:1851-9.
- ❖ Lefterova MI, Lazar MA. New developments in adipogenesis. *Trends Endocrinol Metab.* 2009;20:107-14.
- ❖ Lenhert S, Meier MB, Meyer U, Chi L, Wiesmann HP. Osteoblast alignment, elongation and migration on grooved polystyrene surfaces patterned by Langmuir-Blodgett lithography. *Biomaterials.* 2005;26:563-70.
- ❖ Leverrier Y, Ridley AJ. Apoptosis: caspases orchestrate the ROCK 'n' bleb. *Nat Cell Biol.* 2001;3:339-45.
- ❖ Liao JK, Seto M, Noma K. Rho kinase (ROCK) inhibitors. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2007;50:17-24.
- ❖ Lomri A, Marie PJ. The cytoskeleton in the biology of bone cells. *The Cytoskeleton.* 1996;3:229-263.

- ❖ Long F. Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011;13:27-38.
- ❖ Loesberg WA, te Riet J, van Delft FC, Schön P, Figdor CG, Speller S, van Loon JJ, Walboomers XF, Jansen JA. The threshold at which substrate nanogroove dimensions may influence fibroblast alignment and adhesion. *Biomaterials.* 2007;28:3944-51.
- ❖ Lu J, Rao MP, MacDonald NC, Khang D, Webster TJ. Improved endothelial cell adhesion and proliferation on patterned titanium surfaces with rationally designed, micrometer to nanometer features. *Acta Biomater.* 2008;4:192-201.
- ❖ Lüthen F, Lange R, Becker P, Rychly J, Beck U, Nebe JG. The influence of surface roughness of titanium on beta1- and beta3-integrin adhesion and the organization of fibronectin in human osteoblastic cells. *Biomaterials.* 2005;26(15):2423-40.
- ❖ Martin TJ, Seeman E. Bone remodeling: its local regulation and the emergence of bone fragility. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2008;22:701-22.
- ❖ McBeath R, Pirone DM, Nelson CM, Bhadriraju K, Chen CS. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Dev Cell* 2004;6:483-95.
- ❖ McNamara LE, Sjöström T, Burgess KE, Kim JJ, Liu E, Gordonov S, Moghe PV, Meek RM, Oreffo RO, Su B, Dalby MJ. Skeletal stem cell physiology on functionally distinct titania nanotopographies. *Biomaterials.* 2011;32:7403-10.
- ❖ Monsees TK, Barth K, Tippelt S, Heidel K, Gorbunov A, Pompe W, Funk RH. Effects of different titanium alloys and nanosize surface patterning on adhesion, differentiation, and orientation of osteoblast-like cells. *Cells Tissues Organs.* 2005;180:81-95.
- ❖ Nobes CD, Hall A. Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement, *J Cell Biol.* 1999;144:1235-44.
- ❖ Oakley C, Brunette DM. The sequence of alignment of microtubules, focal contacts and actin filaments in fibroblasts spreading on smooth and grooved titanium substrata. *J Cell Sci.* 1993;106:343-354.
- ❖ Oh S, Brammer KS, Li YS, Teng D, Engler AJ, Chien S, Jin S. Stem cell fate dictated solely by altered nanotube dimension. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;106:2130-5.
- ❖ Oka Y, Nishijima M, Hiraga K, Yatsuzuka M. Effect of ion implantation layer on adhesion of DLC film by plasma-based ion implantation and deposition. *Surf Coat Tech.* 2007;201:6647-50.
- ❖ Okazaki Y, Gotoh E. Comparison of metal release from various metallic biomaterials in vitro. *Biomaterials.* 2005;26:11-21.
- ❖ Palazzo AF, Cook TA, Alberts AS, Gundersen GG. mDia mediates Rho-regulated formation and orientation of stable microtubules. *Nat Cell Biol.* 2001;3:723-9.
- ❖ Peng R, Yao X, Ding J. Effect of cell anisotropy on differentiation of stem cells on micropatterned surfaces through the controlled single cell adhesion. *Biomaterials.* 2011; 32:8048-57.
- ❖ Pertz O, Hodgson L, Klemke RL, Hahn KM. Spatiotemporal dynamics of RhoA activity in migrating cells. *Nature.* 2006;440:1069-72.
- ❖ Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999;284:143-7.
- ❖ Platon F, Fournier P, Rouxel S. Tribological behaviour of DLC coatings compared to different materials used in hip joint prostheses. *Wear.* 2001;250:227-36.
- ❖ Porter AG, Jänicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ.* 1999;6:99-104.

- ❖ Pot SA, Liliensiek SJ, Myrna KE, Bentley E, Jester JV, Nealey PF, Murphy CJ. Nanoscale topography-induced modulation of fundamental cell behaviors of rabbit corneal keratocytes, fibroblasts, and myofibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51:1373-81.
- ❖ Provenzano PP, Inman DR, Eliceiri KW, Trier SM, Keely PJ. Contact guidance mediated three-dimensional cell migration is regulated by Rho/ROCK-dependent matrix reorganization. *Biophys J*. 2008;95:5374-84.
- ❖ Puckett S, Pareta R, Webster TJ. Nano rough micron patterned titanium for directing osteoblast morphology and adhesion. *Int J Nanomedicine*. 2008;3:229-41.
- ❖ Raftopoulou M, Hall A. Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev Biol*. 2004;265:23-32.
- ❖ Rajnicek AM, Foubister LE, McCaig CD. Alignment of corneal and lens epithelial cells by co-operative effects of substratum topography and DC electric fields. *Biomaterials*. 2008;29:2082-95.
- ❖ Recum A F, van Kooten T G. The influence of micro-topography on cellular response and the implications for silicone implants. *J Biomater Sci Polymer Ed*. 1995;7:181-98.
- ❖ Ren XD, Kiosses WB, Schwartz MA. Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton. *Embo J*. 1999;18:578-85.
- ❖ Ricci JL, Grew JC, Alexander H. Connective-tissue responses to defined biomaterial surfaces. I. Growth of rat fibroblast and bone marrow cell colonies on microgrooved substrates. *J Biomed Mater Res A*. 2008;85:313-25.
- ❖ Ridley AJ, Hall A. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell*. 1992;70:389-99.
- ❖ Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, Horwitz AR. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science*. 2003;302:1704-9.
- ❖ Roy ME, Whiteside LA, Katerberg BJ. Diamond-like carbon coatings enhance scratch resistance of bearing surfaces for use in joint arthroplasty: hard substrates outperform soft. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2008;89:527-35.
- ❖ Roy RK, Lee KR. Biomedical applications of diamond-like carbon coatings: a review. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2007;83:72-84.
- ❖ Saldaña L, Vilaboa N, Vallés G, González-Cabrero J, Munuera L. Osteoblast response to thermally oxidized Ti6Al4V alloy. *J Biomed Mater Res A*. 2005;73:97-107.
- ❖ Saldaña L, González-Carrasco JL, Rodríguez M, Munuera L, Vilaboa N. Osteoblast response to plasma-spray porous Ti6Al4V coating on substrates of identical alloy. *J Biomed Mater Res A*. 2006;77:608-17.
- ❖ Saldaña L, Barranco V, González-Carrasco JL, Rodríguez M, Munuera L, Vilaboa N. Thermal oxidation enhances early interactions between human osteoblasts and alumina blasted Ti6Al4V alloy. *J Biomed Mater Res A*. 2007;81:334-46.
- ❖ Schwartz M. Rho signalling at a glance. *J Cell Sci*. 2004;117:5457-8.
- ❖ Schwartz Z, Olivares-Navarrete R, Wieland M, Cochran DL, Boyan BD. Mechanisms regulating increased production of osteoprotegerin by osteoblasts cultured on microstructured titanium surfaces. *Biomaterials*. 2009;30:3390-6.
- ❖ Siebers MC, ter Brugge PJ, Walboomers XF, Jansen JA. Integrins as linker proteins between osteoblasts and bone replacing materials. A critical review. *Biomaterials*. 2005 ;26:137-46.
- ❖ Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*. 1997;89:309-19.

- ❖ Singh A, Ehteshami G, Massia S, He J, Storer RG, Raupp G. Glial cell and fibroblast cytotoxicity study on plasma-deposited diamond-like carbon coatings. *Biomaterials*. 2003;24:5083-9.
- ❖ Smith LA, Liu X, Hu J, Wang P, Ma PX. Enhancing osteogenic differentiation of mouse embryonic stem cells by nanofibers. *Tissue Eng Part A*. 2009;15:1855-64.
- ❖ Smith KE, Hyzy SL, Sunwoo M, Gall KA, Schwartz Z, Boyan BD. The dependence of MG63 osteoblast responses to (meth)acrylate-based networks on chemical structure and stiffness. *Biomaterials*. 2010;31:6131-41.
- ❖ Soininen A, Levon J, Katsikogianni M, Myllymaa K, Lappalainen R, Konttinen YT, Kinnari TJ, Tiainen VM, Missirlis Y. In vitro adhesion of staphylococci to diamond-like carbon polymer hybrids under dynamic flow conditions. *J Mater Sci Mater Med*. 2011;2:629-36.
- ❖ Stepien E, Stanis J, Korohoda W. Contact guidance of chick embryo neurons on single scratches in glass and on underlying aligned human skin fibroblasts. *Cell Biol Int*. 1999;23:105-116.
- ❖ Stein GS, Lian JB, Stein JL, Van Wijnen AJ, Montecino M. Transcriptional control of osteoblast growth and differentiation. *Physiol Rev*. 1996;76:593-629.
- ❖ Su WT, Liao YF, Chu IM. Observation of fibroblast motility on a micro-grooved hydrophobic elastomer substrate with different geometric characteristics. *Micron*. 2007; 38:278-85.
- ❖ Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126:663-76.
- ❖ Teixeira AI, Abrams GA, Bertics PJ, Murphy CJ, Nealey PF. Epithelial contact guidance on well-defined micro- and nanostructured substrates. *J Cell Sci*. 2003;116:1881-92.
- ❖ Teixeira AI, McKie GA, Foley JD, Bertics PJ, Nealey PF, Murphy CJ. The effect of environmental factors on the response of human corneal epithelial cells to nanoscale substrate topography. *Biomaterials*. 2006;27:3945-54.
- ❖ Théry M, Racine V, Piel M, Pépin A, Dimitrov A, Chen Y, Sibarita JB, Bornens M. Anisotropy of cell adhesive microenvironment governs cell internal organization and orientation of polarity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103:19771-6.
- ❖ Théry M, Bornens M. Cell shape and cell division. *Curr Opin Cell Biol*. 2006;18:648-57.
- ❖ Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: Enemies Within. *Science*. 1998;281:1312-6.
- ❖ Tiainen VM. Amorphous carbon as a bio-mechanical coating - mechanical properties and biological applications. *Diam Relat Mater*. 2001;10:153-60.
- ❖ Tiainen VM, Soininen A, Alakoski E, Konttinen YT. In situ surface oxide reduction with pulsed arc discharge for maximum adhesion of diamond-like carbon coatings. *Diam Relat Mater*. 2008;17:2071-4.
- ❖ Tipler PA. "Física" Reverté Ed. 1978, Barcelona.
- ❖ Trisi P, Rao W, Rebaudi A. A Histometric Comparison of smooth and rough titanium implants in human low-density jawbone. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1999; 14: 689-698.
- ❖ Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, Ono T, Kawahara T, Morishita T, Tamakawa H, Yamagami K, Inui J, Maekawa M, Narumiya S. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature*. 1997;389:990-994.
- ❖ Väänänen HK, Zhao H, Mulari M, Halleen JM. The cell biology of osteoclast function. *J Cell Sci*. 2000;113:377-381.
- ❖ Vicente-Manzanares M, Choi CK, Horwitz AR. Integrins in cell migration - the actin connection. *J Cell Sci*. 2009;122:199-206.
- ❖ Vogel V, Sheetz M. Local force and geometry sensing regulate cell functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7:265-75.
- ❖ Vogelsgesang M, Pautsch A, Aktories K. C3 exoenzymes, novel insights into structure and action of Rho-ADP-ribosylating toxins. *NS Arch Pharmacol*. 2007;374:347-60.

- ❖ Walboomers XF, Croes HJ, Ginsel LA, Jansen JA. Growth behavior of fibroblasts on microgrooved polystyrene. *Biomaterials*. 1998;19:1861-8.
- ❖ Wapner KL. Implications of metallic corrosion in total knee arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res*. 1991;271:12-20.
- ❖ Watari S, Hayashi K, Wood JA, Russell P, Nealey PF, Murphy CJ, Genetos DC. Modulation of osteogenic differentiation in hMSCs cells by submicron topographically-patterned ridges and grooves. *Biomaterials*. 2012;33:128-36.
- ❖ Watkins BA, Lippman HE, Le Bouteiller L, Li Y, Seifert MF. Bioactive fatty acids: role in bone biology and bone cell function. *Prog Lipid Res*. 2001;40:125-48.
- ❖ Webster TJ, Ejirofor JU. Increased osteoblast adhesion on nanophase metals: Ti, Ti6Al4V, and CoCrMo. *Biomaterials*. 2004;25:4731-9.
- ❖ Wei J, Igarashi T, Okumori N, Igarashi T, Maetani T, Liu B, Yoshinari M. Influence of surface wettability on competitive protein adsorption and initial attachment of osteoblasts. *Biomed Mater*. 2009;4:045002.
- ❖ Weiss P. Experiments on cell and axon orientation in vitro; the role of colloidal exudates in tissue organization. *J Exp Zool*. 1945;100:353-86.
- ❖ Wheeler AP, Ridley AJ. Why three Rho proteins? RhoA, RhoB, RhoC, and cell motility. *Exp Cell Res*. 2004;301:43-9.
- ❖ Williams DF, Black J, Doherty PJ. Second consensus conference on definitions in biomaterials, Chester, England. In: Doherty PJ, Williams RF, Williams DF, Lee AJC, eds. *Biomaterial - tissue interfaces*. Advances in biomaterials. Elsevier, 1992, Amsterdam.
- ❖ Wierzbicka-Patynowski I, Schwarzbauer JE. The ins and outs of fibronectin matrix assembly. *J Cell Sci*. 2003;116:3269-76.
- ❖ Wojciak-Stothard B, Curtis ASG, Monaghan W, McGrath M, Sommer I, Wilkinson CDW. Role of the cytoskeleton in the reaction of fibroblasts to multiple grooved substrata. *Cell Motil Cytoskel*. 1995;31:147-158.
- ❖ Yang RS, Tang CH, Ling QD, Liu SH, Fu WM. Regulation of fibronectin fibrillogenesis by protein kinases in cultured rat osteoblasts. *Mol Pharmacol*. 2002;61:1163-73.
- ❖ Yang CH, Wang YT, Tsai WF, Ai CF, Lin MC, Huang HH. Effect of oxygen plasma immersion ion implantation treatment on corrosion resistance and cell adhesion of titanium surface. *Clin Oral Implants Res*. 2011;22:1426-32.
- ❖ Yang X, Cai X, Wang J, Tang H, Yuan Q, Gong P, Lin Y. Mechanical stretch inhibits adipogenesis and stimulates osteogenesis of adipose stem cells. *Cell Prolif*. 2012;45:158-66.
- ❖ Yao ZQ, Ivanisenko Y, Diemant T, Caron A, Chuvilin A, Jiang JZ, Valiev RZ, Qi M, Fecht HJ. Synthesis and properties of hydroxyapatite-containing porous titania coating on ultrafine-grained titanium by micro-arc oxidation. *Acta Biomater*. 2010;6:2816-25.
- ❖ Yoo JU, Barthel TS, Nishimura K, Solchaga L, Caplan AI, Goldberg VM, Johnstone B. The chondrogenic potential of human bone marrow derived mesenchymal progenitor cells. *J Bone Joint Surg*. 1998;80-A: 1745-57.
- ❖ Yoshii T, Sotome S, Torigoe I, Maehara H, Sugata Y, Yamada T, Shinomiya K, Okawa A. Isolation of osteogenic progenitor cells from trabecular bone for bone tissue engineering. *Tissue Eng Part A*. 2010;16:933-42.
- ❖ Young MF. Bone matrix proteins: more than markers. *Calcif Tissue Int*. 2003;72:2-4.
- ❖ Zhao JM, Tsuru K, Hayakawa S, Osaka A. Modification of Ti implant surface for cell proliferation and cell alignment. *J Biomed Mater Res A*. 2008;84:988-93.
- ❖ Zhou G, Liu W, Cui L, Wang X, Liu T, Cao Y. Repair of porcine articular osteochondral defects in non-weight bearing areas with autologous bone marrow stromal cells. *Tissue Eng*. 2006;12:3209-21.

- ❖ Zhou F, Yuan L, Huang H, Chen H. Phenomenon of “contact guidance” on the surface with nano-micro-groove-like pattern and cell physiological effects. *Chinese Sci Bull.* 2009, 54: 3200-5
- ❖ Zhu J, Li J, Wang B, Zhang WJ, Zhou G, Cao Y, Liu W. The regulation of phenotype of cultured tenocytes by microgrooved surface structure. *Biomaterials.* 2010;31:6952-6958.
- ❖ Zhu H, Cao B, Zhen Z, Laxmi AA, Li D, Liu S, Mao C. Controlled growth and differentiation of MSCs on grooved films assembled from monodisperse biological nanofibers with genetically tunable surface chemistries. *Biomaterials.* 2011;32:4744-52.
- ❖ Zimerman B, Volberg T, Geiger B. Early molecular events in the assembly of the focal adhesion stress fiber complex during fibroblast spreading. *Cell Motil Cytoskeleton.* 2004; 58(3):143-159.
- ❖ Zysset PK, Guo XE, Hoffler CE, Moore KE, Goldstein SA. Elastic modulus and hardness of cortical and trabecular bone lamellae measured by nanoindentation in the human femur. *J Biomech.* 1999;32:1005-12.

APÉNDICE

Los datos incluidos en esta Tesis Doctoral han sido empleados en la elaboración de las siguientes publicaciones científicas:

- ❖ **A. Calzado- Martín**, L. Saldaña, H. Korhonen, A. Soininen, T.J. Kinnari, E. Gómez-Barrena, V.M. Tiainen, R. Lappalainen, L. Munuera, Y.T. Konttinen, N. Vilaboa. Interactions of human bone cells with diamond-like carbon polymer hybrid coatings. *Acta Biomater.* 2010;6:3325-38.
- ❖ **A. Calzado-Martín**, A. Méndez-Vilas, M. Multigner, L. Saldaña, J.L. González-Carrasco, M.L. González-Martín, N. Vilaboa. On the role of RhoA/ROCK signaling in contact guidance of bone-forming cells on anisotropic Ti6Al4V surfaces. *Acta Biomater.* 2011;7:1890-1901.

Además, durante el periodo de realización de esta Tesis Doctoral se ha participado en la realización de los siguientes trabajos:

- ❖ A.M. Gallardo-Moreno*, M. Multigner*, **A. Calzado-Martín***, A. Méndez-Vilas, L. Saldaña, J.C. Galván, M.A. Pacha-Olivenza, J. Perera-Núñez, J.L. González-Carrasco, I. Bracerías, N. Vilaboa, M.L. González-Martín. Bacterial adhesion reduction on a biocompatible Si⁺ ion implanted austenitic stainless steel. *Mat Sci Eng C.* 2011; 31(7): 1567-1576.
- ❖ J.C. Galván, L. Saldaña, M. Multigner, **A. Calzado-Martín**, M. Larrea, C. Serra, N. Vilaboa, J.L. González-Carrasco. Grit blasting of medical stainless steel: implications on its corrosion behavior, ion release and biocompatibility. *J Mater Sci Mater Med.* 2012; 23:657-66.

* Los tres primeros autores contribuyen igualmente a este trabajo